



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Immunohistokemisk evaluering av hundallergenerna Can f 1, Can f 2 och Can f 3 i vävnad hos hund

Melinda Johannesson

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:28*

Immunohistokemisk evaluering av hundallergenerna Can f 1, Canf 2 och Can f 3 i vävnad hos hund

Immunohistochemical detection of dog allergens Can f 1, Can f 2 and Can f 3 in tissues from dogs

Melinda Johannesson

Handledare: Kerstin Bergvall, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Helene Hamlin, institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0736

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:28

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Hundallergener, Can f 1, Can f 2, Can f 3, immunohistokemi, hud, tunga, parotisspottkörtel

Key words: Dog allergens, Can f 1, Can f 2, Can f 3, immunohistochemistry, skin, tongue, parotid gland

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Pälsdjursallergi och däribland allergi mot hundar drabbar både barn och vuxna och är relativt vanligt förekommande i den industrialiserade delen av världen. I dagsläget finns kännedom om sex hundallergener varav fyra utgörs av lipokaliner, en viktig proteinfamilj i allergensammanhang. Bland de sex allergenerna finns även albumin och ett kallikrein. Hundsaliv ses idag som en viktig källa till allergenspridning, dels via kontakt med hundsaliv men även via spridning av saliv till hundens päls när hunden slickar sig varpå allergenerna överförs till miljön med päls och mjäll. I dagsläget saknas studier där allergenförekomst i olika vävnader hos hund har studerats med immunohistokemi. I denna studie har därför immunohistokemisk evaluering av tre av de idag kända allergenerna, Can f 1, Can f 2 och Can f 3, genomförts i tunga och hud från 14 hundar samt parotisspottkörtel från 10 hundar. I studien användes Vectastain Elite Mouse IgG ABC Kit, 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride för antigendetektion samt primärantikroppar i form av mus-IgG framtaget mot rekombinanta former av Can f 1 och Can f 2 samt naturligt Can f 3.

Resultatet visar på en tydlig detektion med anti-Can f 1-antikropparna i tungans epitel (13/14 hundar) samt i mindre grad i viabla epidermis (4/14) och hårfollikelceller (5/14). En tydlig detektion med anti-Can f 3-antikropparna var vanligt förekommande i bindvävsstrukturer i samtliga tre undersökta vävnader. Anti-Can f 3 gav även upphov till detektion av varierande grad i viabla epidermis (13/14), basalmembran mellan epidermis och dermis (14/14) och runt hårfolliklar (14/14), samt i hårfollikelceller (14/14). Någon tydlig detektion kunde inte påvisas med anti-Can f 1 och anti-Can f 2 i parotisspottkörtelns sekretoriska delar. En svagare detektion i körtelns bindvävsstrukturer, som var starkare/intensivare jämfört med kontroller, kunde dock ses med anti-Can f 1 (7/10).

Allergenförekomst i saliven med senare spridning över hundens hud och päls skulle kunna förklara antigendetektionen med anti-Can f 1 i tungepitel respektive viabla epidermis och hårfollikelceller. Detta via diffusion in i cellerna från saliven. Även produktion av Can f 1 i dessa lokalisationer är en tänkbar orsak till detektionen. Albumin förekommer även extravaskulärt, varför detektionen i bindvävsstrukturer med anti-Can f 3 kan motsvaras av förekomst av albumin/Can f 3. Detektionen med anti-Can f 3 i övriga hudstrukturer kan vara orsakad av diffusion av allergenet från bindväven.

Grad av antigendetektion tenderade till att variera mellan olika hundar, vilket skulle kunna relateras till individuella skillnader i utsöndring av allergener och allergenförekomst hos olika hundindivider. Det ofta framförda resonemanget att hundallergiker tål vissa hundar men inte andra skulle kunna relateras till detta. Frånvaron av tydlig detektion med anti-Can f 1 och anti-Can f 2 i parotisspottkörtelns sekretoriska delar motsäger inte allergenförekomst i denna lokalisation, utan talar snarare för behovet av fortsatt utveckling av metoden för att möjliggöra framtida allergendetektion i denna vävnad.

SUMMARY

Dog allergy and allergy to furry animals in general is relatively common in the industrialized part of the world. Up until today six different allergens have been identified in the dog, four of them belonging to the lipocalin protein family, one consists of dog albumin and the last one is a kallikrein. Dog saliva is considered to be a major allergen source, partly by direct contact with saliva, but also through spreading of saliva to the fur when the dog is grooming. Subsequent shedding of dander and fur spreads allergen to the environment. The present study sets out to evaluate the presence of three different dog allergens, Can f 1, Can f 2 and Can f 3, in tongue and skin from 14 dogs and parotid gland from 10 dogs. In the study we used the Vectastain Elite Mouse IgG ABC Kit, 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride for antigen detection and IgG primary antibodies produced in mice against recombinant forms of Can f 1 and Can f 2 and the natural form of Can f 3.

We could see a clear detection with the anti-Can f 1 antibodies in tongue epithelium (13/14) and to a lesser extent in viable epidermis (4/14) and cells of hair follicles (5/14). Anti-Can f 3 gave a distinct detection in connective tissue in all three organs studied. With anti-Can f 3, a detection of variable degree was also seen in viable epidermis (13/14), basement membrane beneath epidermis (14/14), basement membrane around hair follicles (14/14) and in cells of hair follicles (14/14). With anti-Can f 1 and anti-Can f 2, no clear detection was seen in the secretory parts of the parotid gland. However, detection more intense than with the negative controls was seen in connective tissue within the gland with anti-Can f 1 (7/10).

The presence of allergens in saliva with subsequent spreading to the dog's hair and skin could explain the antigen detection seen with anti-Can f 1 in tongue epithelium, viable epidermis and cells of hair follicles, if spreading of allergens into these locations by means of diffusion is considered a possibility. Production of Can f 1 in these cells may also be considered as a cause to the detection seen. Albumin is present in the extravascular compartments and detection with anti-Can f 3 in connective tissue can therefore be caused by presence of the allergen. The detection seen with anti-Can f 3 in other locations of the skin is possibly caused by diffusion of the allergen from the surrounding connective tissue.

The level of antigen detection seemed to vary between different dogs, which could mirror individual differences in allergen expression and spreading amongst dogs. This could be in accordance with the often claimed situation where people allergic to dogs seem to react to some dogs while tolerating others. The absence of antigen detection with anti-Can f 1 and anti-Can f 2 in the secretory parts of the parotid gland does not contradict the presence of these allergens in the gland. Instead it prompts for further development of the detection method used in this study, to enable future allergen detection in this tissue.

INNEHÅLL

Förkortningar.....	1
Inledning.....	1
Syfte och frågeställningar.....	1
Litteraturoversikt.....	1
Den allergiska reaktionen.....	1
Hundallergener.....	3
Multimera rekombinanta allergen.....	4
Allergenspridning till miljön.....	4
Lipokaliner.....	4
Albumin.....	6
Kallikrein.....	7
Korsreaktivitet.....	7
Undersökta vävnader – histologi och funktion.....	8
Hud.....	8
Tunga.....	11
Parotisspottkörtel.....	12
Material och metoder.....	13
Insamling av vävnadsprover.....	13
Snittning och immunohistokemisk färgning.....	13
Monoklonalantikroppar och kontroller.....	14
Neutralisering av anti-Can f 1 i tunga samt anti-Can f 3 i hud.....	15
Can f 1.....	15
Can f 3.....	15
Resultat.....	15
Hud.....	15
Can f 1.....	15
Can f 2.....	20
Can f 3.....	20
Mus IgG kontroll samt negativ kontroll.....	23
Tunga.....	25
Can f 1.....	25
Can f 2 och Can f 3.....	27
Mus IgG kontroll samt negativ kontroll.....	29
Parotisspottkörtel.....	32
Can f 1.....	32
Can f 2.....	32
Can f 3.....	33
Mus IgG kontroll samt negativ kontroll.....	34
Neutralisering av anti-Can f 1 i tunga.....	36
Neutralisering av anti-Can f 3 i hud.....	36
Diskussion.....	36
Om påvisande av antigen i de olika vävnaderna.....	36
Can f 1 och Can f 2 i parotisspottkörtel.....	36
Can f 3 i parotisspottkörtel, hud och tunga.....	37
Can f 1 och Can f 2 i hud och tunga.....	39
Felkällor.....	40

Konklusion	41
Referenser.....	41

FÖRKORTNINGAR

Anti-Can f 1, anti-Can f 2 och anti-Can f 3: antikroppar mot respektive hundallergen

DAB: 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

HSPA: human seminal plasma allergy

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

2D PAGE: Två dimensionell polyakrylamidgelelektrofores

INLEDNING

Allergiska sjukdomar och däribland pälsdjursallergi är något som drabbar en relativt stor del av befolkningen i de industrialiserade delarna av världen (Nilsson *et al.*, 2014a). Detta komplicerar och begränsar vardagen för många människor, dels för dem som själva har en allergi mot pälsdjur men även för de människor som på något sätt lever tillsammans med en individ med allergi. Allergi är en typ av hypersensitivitetsreaktion som medieras av IgE-antikroppar och mastceller (Tizard, 2009). Detta ger hos drabbade individer upphov till symptom som exempelvis allergisk rinit, hudsymptom eller astma, medan det hos somliga även kan ge upphov till anafylaktisk chock (Janeway *et al.*, 2005).

Det finns hos många allergiska individer en önskan om att trots sjukdomen ändå kunna leva och arbeta med djurkontakt. Forskning och utveckling kring diagnostik och behandling av allergi går framåt. Som ett exempel kan nämnas att det pågår utveckling kring möjligheten att matcha en allergisk individ med en hund med för just den personen passande allergenprofil (Medi-Tec, 2015b). Det är idag även möjligt att framställa så kallade rekombinanta allergener från exempelvis hund, vilket avsevärt kan förbättra möjligheten till korrekt och effektiv diagnostik och behandling (Nilsson *et al.*, 2014a). Rekombinanta allergener är allergener framtagna genom molekylärbiologiska tekniker (Valenta *et al.*, 1999).

Vid kattallergi är det framför allt ett allergen, Fel d 1, som majoriteten (ca 94 %) av kattallergiker reagerar på (van Ree *et al.*, 1999). Hos hund har idag sex stycken olika allergener identifierats; Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5 och Can f 6 (Nilsson *et al.*, 2014a). Till skillnad från förhållandet vid kattallergi verkar inte något av de idag kända hundallergenerna vara lika dominant som Fel d 1 (Medi-Tec, 2015a, Nilsson *et al.*, 2014b). Detta gör det mer komplicerat både att korrekt diagnosticera hundallergi och att behandla hundallergi med allergenspecifik immunoterapi. Fortsatta studier inom ämnet hundallergi är nödvändiga och däribland studier kring allergenförekomst hos hundar.

Syfte och frågeställningar

Förekomst av och karakteristika hos hundallergener har undersökts av flertalet forskargrupper. Det verkar dock saknas studier där försök gjorts att påvisa allergenerna och dess lokalisation eller uttryck i vävnadssnitt med immunohistokemi. I det här examensarbetet är därför syftet att med hjälp av immunohistokemi försöka påvisa hundallergenerna Can f 1, Can f 2 och Can f 3 i tunga, parotisspottkörtel samt hud hos hund.

Frågeställningarna är i vilken/vilka av de studerade vävnaderna allergenerna kan påvisas samt var i dessa vävnader en eventuell detektion kan ses.

LITTERATURÖVERSIKT

Den allergiska reaktionen

Allergi är en typ av hypersensitivitetsreaktion som medieras av IgE-antikroppar och mastceller (Tizard, 2009) och som även leder till vävnadsinfiltration av lymfocyter och eosinofiler. Allergi uppkommer när en individs immunförsvar reagerar på antigen (även kallat allergen) som i sig inte är

skadliga. Antigen plockas upp av så kallade antigenpresenterande celler, exempelvis dendritceller, makrofager men också B-celler/B-lymfocyter (Tizard, 2009). Dessa antigenpresenterande celler processar antigenet för att sedan presentera mindre delar av det på ytmolekyler, MHC klass II, för naiva T-lymfocyter (naiva Th-celler) med antigenreceptorer som matchar det aktuella antigenet. Den mest effektiva antigenpresenterande celltypen är dendritceller (Tizard, 2009). Dendritceller producerar olika typer av signalmolekyler, interleukiner (IL), beroende på vilken typ av antigen de plockat upp. Dessa signalmolekyler kommer att påverka Th-cellerna och styra det förvärvade immunförsvaret antingen mot ett antikroppsmedierat immunsvaret eller ett cellmedierat immunsvaret. Om dendritcellen producerar IL-4, IL-1 och IL-6 kommer det leda till stimulering av Th2-celler och ett antikroppsmedierat immunsvaret (Tizard, 2009). Dendritceller behöver också uttrycka co-stimulerande ytmolekyler, exempelvis CD 80/86 och CD40, för att Th-cellerna ska stimuleras. De på detta vis aktiverade Th2-cellerna stimulerar vidare aktivering och differentiering av B-celler vilka producerar antikroppar. Endast B-celler som uttrycker receptorer för det aktuella antigenet kommer att stimuleras. Denna stimulering sker genom sekretion av interleukiner och uttryck av co-stimulerande ytmolekyler (CD40). IL-4 och IL-13 stimulerar till produktion av IgE-antikroppar hos B-celler (Tizard, 2009). Dessa IgE-antikroppar binder sedan till olika celler via IgE-receptorer och individen är sensitiserad. Det finns olika typer av receptorer för IgE (FcεR) (Tizard, 2009). Mastceller uttrycker en högaffinitetsform av FcεRI. Denna receptor förekommer också på eosinofiler och basofiler.

Mastceller finns i vävnader där kontakt sker med miljön utanför kroppen (Metcalf *et al.*, 1997). De är framför allt lokaliserade nära blodkärl och nerver i dessa vävnader. Mastceller finns exempelvis i submukosa och epitel i luftvägarna, i tunntarmarnas mukosa och submukosa samt i huden (Fajt & Wenzel, 2013. Irani *et al.*, 1986). Mastcellerna bildas i benmärgen (Metcalf *et al.*, 1997). Bortsett från transporten av mastcellsprekursorer i blodet till den vävnad där de sedan stannar kvar och mognar, förekommer inte mastceller som cirkulerande blodceller (Fajt & Wenzel, 2013).

Den allergiska reaktionen utlöses när en sensitiserad individ åter exponeras för antigenet/allergen. När antigen korsbinder IgE på mastcellerna leder det till degranulering av cellerna och det sker en frisättning av ett flertal proinflammatoriska och vasoaktiva mediatorer exempelvis histamin och prostaglandiner (Janeway *et al.*, 2005, Tizard, 2009). Många av de substanser som mastceller producerar kan även produceras av basofiler (Abbas *et al.*, 2010). Basofiler uttrycker också FcεRI (Tizard, 2009) och kan därmed binda IgE, varför de också har en roll i den allergiska reaktionen (Abbas *et al.*, 2010). Basofiler förekommer framför allt som cirkulerande blodceller (Abbas *et al.*, 2010), men kan lockas ut i vävnaden där inflammation föreligger. Vissa kemokiner från T-celler stimulerar basofiler till utträde till vävnaden (Tizard, 2009).

Den allergiska reaktionen ger dels upphov till symptom som kommer strax efter allergenexponering, en så kallad omedelbar allergisk reaktion medierad av mastceller (Tizard, 2009) men även av basofiler (Abbas *et al.*, 2010). Det sker också en sen allergisk reaktion som når sitt maximum efter 6-12 timmar (Tizard, 2009). Kemokiner som produceras av mastceller leder till rekrytering av leukocyter, framför allt Th2-celler och eosinofiler, till vävnaden (Abbas *et al.*, 2010). Frisättning av inflammatoriska mediatorer från bland annat eosinofiler leder till utveckling av den sena allergiska reaktionen (Tizard, 2009). Vid fortsatt antigenexponering kan kronisk inflammation utvecklas från den sena allergiska reaktionen (Janeway *et al.*, 2005).

Allergener är antigen som utgörs av små proteiner eller glykoproteiner (Morris, 2010) vilka ofta är lösliga i kroppsvätskor (Abbas *et al.*, 2010) och inkluderar bland annat enzymer, transportproteiner och enzymhämmare (Stewart & Thompson, 1996: se Rouvinen *et al.*, 1999). Allergener förekommer bland annat i dammkvalster, pollen, mjäll från djur (Abbas *et al.*, 2010) samt mögelsporer (Janeway *et al.*, 2005). Den höga lösligheten hos många allergener gör det möjligt att diffundera in i slemhinnor (Janeway *et al.*, 2005), varför allergenexponering kan ske via exempelvis luftvägarna eller konjunktiva. Den vanligaste vägen att exponeras för allergen hos människa är via inhalation. Allergenexponering kan även ske via huden (Abbas *et al.*, 2010), och allergen kan tas upp perkutant.

När en allergisk reaktion uppstår hos människa orsakar den ofta symptom i form av så kallad hösnuva eller allergisk rinit, med irritation och täthet i näsan samt ett ökat näsflöde, klåda och nysningar (Janeway *et al.*, 2005, Abbas *et al.*, 2010). Leukocytinfiltration med ödem i slemhinnan och ökad slemsekretion kan ses i samband med reaktionen Abbas *et al.*, 2010). Symptom från ögonen i form av allergisk konjunktivit kan ofta kopplas till hösnuva. Allergisk astma med kronisk inflammation i de nedre luftvägarna förekommer också (Janeway *et al.*, 2005). Astmasymptomen utlöses av att mastceller i submukosan aktiveras och degranuleras av allergen, men vid den kroniska inflammationen ses långvarig förekomst av eosinofiler, Th2-lymfocyter och neutrofiler i ökat antal. Degranuleringen av mastcellerna orsakar ökad sekretionen av slem och konstriktion av bronker. Den kroniska inflammationen orsakar hypertrofi och hyperplasi av slemproducerande celler och glatta muskellager samt fibros. Luftvägarna blir permanent trängre.

Symptom från huden kan också förekomma i form av utrikaria och eksem (Abbas *et al.*, 2010). Utrikaria kan uppkomma dels av allergen som injicerats eller tagits upp från magtarmkanalen, men även efter hudkontakt med allergen. De röda och kliande svullnaderna är resultatet av histaminfrisättning från mastceller (Janeway *et al.*, 2005). Eksem, eller atopisk dermatit, med ihållande hudutslag (Janeway *et al.*, 2005) kan vara orsakat av den sena allergiska inflammationsreaktionen (Abbas *et al.*, 2010). Här stimuleras inflammation genom att mastceller och Th2-celler frisätter IL-4 och andra cytokiner vilka verkar på endotelceller i venuler.

I det fall allergenet injiceras direkt i blodet kan anafylaktisk chock uppkomma när mastceller kring blodkärlen reagerar på allergenet (Janeway *et al.*, 2005). Detta kan också inträffa om allergenet absorberas snabbt från magtarmkanalen. Anafylaktisk chock orsakas av en vida utbredd mastcellsaktivering med efterföljande bronkokonstriktion (Janeway *et al.*, 2005) samt vasodilatation (Abbas *et al.*, 2010).

Hundallergener

I dagsläget finns kännedom om sex olika hundallergener från tre olika proteinfamiljer (Nilsson *et al.*, 2014a). Allergenen benämns Can f 1, Can f 2, Can f 3, Can f 4, Can f 5 och Can f 6. Can f är en förkortning av *Canis familiaris*, artnamnet för hund. Till proteinfamiljen lipokaliner hör Can f 1, Can f 2, Can f 4 och Can f 6. Can f 3 tillhör albuminfamiljen och Can f 5 utgörs av ett kallikrein (Nilsson *et al.*, 2014a). Av kända allergen hos pälsdjur är mer än 50 % lipokaliner och ofta utgörs de kliniskt mest betydelsefulla allergenerna hos arten av lipokaliner (Nilsson *et al.*, 2014a). Olika studier uppvisar något varierande siffror gällande andel IgE-reaktivitet mot de i nuläget kända hundallergenerna. Enligt Rytönen-Nissinen *et al.* (2015) kan faktorer så som vilken metod som använts, hur studiepopulationen såg ut, vilka allergenberedningar som använts samt på vilket sätt studieindividerna exponerats för allergenen bidra till sådana skillnader i resultat. I en studie utförd av Konieczny *et al.* (1997) visade 75 % av i studien ingående hundallergiker IgE-reaktivitet mot Can f 1. Motsvarande siffra för Can f 2 var endast 25%. I en annan studie, Nilsson *et al.* (2012), anges istället motsvarande procentandel vara 55 % för Can f 1 respektive 24 % för Can f 2. Avseende Can f 3, som utgörs av serumalbumin (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2014a), anger Matsson *et al.* (2009) att så få som 16 % av hundallergiker uppvisar IgE-reaktivitet mot detta allergen. Albuminallergen från olika däggdjur är mycket lika varandra och likhet mellan serumalbumin hos människa och andra däggdjursarter kan vara en bidragande orsak till varför många allergiker inte reagerar på albuminallergener (Nilsson *et al.*, 2014a). Matsson *et al.* (2010) rapporterade 35 % Can f 4 IgE-reaktivitet bland hundallergiker. När Can f 5 har studerats har så många som 70 % av hundallergiker uppvisat IgE-reaktivitet mot allergenet (Matsson *et al.*, 2009). Mot Can f 6 har 38 % noterats ha IgE-reaktivitet (Nilsson *et al.*, 2012).

Då en del allergiker endast uppvisar IgE-reaktivitet mot något av de allergen som är mindre vanliga, så kallade ”minor allergens”, måste dessa ändå anses viktiga både vid diagnostik och behandling av allergi (Nilsson *et al.*, 2014a)

Multimera rekombinanta allergen

I dagsläget är diagnostik och behandling av hundallergi baserat på extrakt från hundpäls och mjäll (Nilsson *et al.*, 2014b). Dessa extrakt kan variera mycket i totalt proteininnehåll och även i komposition av hundallergener, vilket gör det troligt att olika extrakt kan ge olika resultat vid allergidiagnostik (Curin *et al.*, 2011). Det är därför eftersträvarsvärt att utveckla diagnostik och behandling med rekombinanta hundallergener (Curin *et al.*, 2011).

År 2014 visade Nilsson *et al.* (2014b) att det är möjligt att designa en multimer av rekombinanta lipokalinallergener från hund, alltså av Can f 1, Can f 2, Can f 4 och Can f 6. Detta utfördes i syfte att förbättra allergidiagnostik- och behandling. Enligt Nilsson *et al.* (2014b) verkar den multimer som designats av gruppen kunna vara användbar både vid diagnostik av hundallergi, på grund av hög sensitivitet, samt vid hyposensibilisering då den utlöser ett starkt IgG-svar men samtidigt låg IgE-produktion och T-cellsaktivering vilket kan innebära ökad säkerhet och effektivitet.

Allergenspridning till miljön

De flesta av de idag kända hundallergenerna finns i saliv samt extrakt från mjäll och päls. Detta gäller för Can f 1, Can f 2, Can f 3 och Can f 6 (Kamata *et al.*, 2007, Polovic *et al.*, 2013). Det är möjligt att saliven är källan till hundallergen, som sedan sprids till päls och hud när hunden slickar sig (Kamata *et al.*, 2007). Päls och mjäll sprider sedan allergenerna till miljön.

Can f 3 förekommer dessutom i serum då det utgörs av serumalbumin (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2014a). Can f 4 har rapporterats finnas i extrakt från mjäll och päls (Rytönen-Nissinen *et al.*, 2015, Matsson *et al.*, 2010). Can f 5 utsöndras framförallt i urin från icke kastrerade hanhundar men har även påvisats i mjäll (Matsson *et al.* 2009). Can f 5 antas produceras i prostata samt har setts minska påtagligt efter kastration (Chapdelaine *et al.*, 1988).

Lipokaliner

Lipokaliner utgör en stor del, mer än 50 %, av de idag kända pälsdjursallergenerna (Nilsson, *et al.*, 2014a). Många av lipokalinproteinerna anses vara transportproteiner då de kan binda små, hydrofoba molekyler (Rouvinen *et al.*, 1999). De små molekylerna binds i en ficka hos lipokalinerna där ytan oftast är hydrofob. Andra funktioner som kan hittas hos denna grupp av proteiner är transport av feromoner och deltagande i syntesen av prostaglandin D₂ i hjärnan (Flower, 1996). Det anses även finnas lipokaliner som har betydelse för luktsinnet. Lipokaliner som grupp är sekventiellt heterogena, men har trots detta en konserverad kristallstruktur eftersom de veckas på ett liknande sätt. De utgörs av ett β -flak med åtta sekvenser som rullats ihop för att forma en cylinder med en α -helix i ena änden. Cylindern är öppen i ena änden och sluten i den andra.

Can f 1

I början av 90-talet lyckades man rena fram Can f 1, som då kallades Ag13, genom immunoaffinitetschromatografi (Schou *et al.*, 1991). Dess molekylvikt rapporterades då ligga någonstans mellan 22 kD och 25 kD. Något lägre molekylvikter för Can f 1, 18 kD respektive 20 kD, har senare registrerats (Kamata *et al.* (2007). En rekombinant form av allergenet har senare framställts av bl.a. Konieczny *et al.* (1997), Saarelainen *et al.* (2004) och Kamata *et al.* (2007).

Enligt Konieczny *et al.* (1997) har Can f 1 en aminosyrasekvens som till stora delar (57 %) liknar ett protein, von Ebners körtelprotein, ett lipokalinprotein som bildas i von Ebners körtlar (Bläker *et al.*, 1993). von Ebners körtlar är spottkörtlar belägna kring de så kallade vallgravspapillerna, på tungans bakre, dorsala del (Mescher, 2010). Enligt Konieczny *et al.* (1997) kan Can f 1 vara hundens homolog till von Ebners körtelprotein.

Gällande studier av allergenets förekomst har Konieczny *et al.* (1997) med Northern blot-teknik påvisat Can f 1 mRNA i epitelvävnad från tunga. Enligt Konieczny *et al.* (1997) innehöll den tungvävnad som användes von Ebners körtelvävnad. I samma studie undersöktes även

parotisspottkörtel samt hud och lever, där man däremot inte lyckades påvisa mRNA för Can f 1. Detta till skillnad från Kamata *et al.* (2007) som lyckades påvisa mRNA för Can f 1 i både parotis- och mandibularisspottkörtel samt ett svagare uttryck även i huden. Man lyckades däremot inte påvisa det i tungvävnad, lever eller njure. Kamata *et al.* (2007) använde sig här av RT-PCR/PCR med omvänd transkription. I samma studie användes antikroppar framtagna mot rekombinant Can f 1 i en immunoblot och författarna menar att man där kunnat detektera allergenet i parotis- och mandibularspottkörtel, saliv och i extrakt från päls och mjäll. Förekomst av allergenet i tunga utvärderades inte i detta försök. Can f 1 kunde vid senare tillfälle återigen detekteras i saliv samt extrakt från mjäll, då med 2D PAGE med efterföljande masspektrometri (Polovic *et al.*, 2013).

Can f 2

Can f 2 har sedan början av 90-talet ansetts som ett mindre viktigt hundallergen i jämförelse med Can f 1 (de Groot *et al.*, 1991). Allergenet har ofta studerats tillsammans med Can f 1. Rekombinanta former av allergenet har tagits fram av bl.a. Konieczny *et al.* (1997) och Saarelainen *et al.* (2004).

Enligt Konieczny *et al.* (1997) uppvisar aminosyrasekvensen hos Can f 2 en del likhet med ”mouse urinary protein”/MUP (29 %) hos mus samt urinary $\alpha(2U)$ -globulin (32 %) hos råtta. Dessa två är lipokalinproteiner vilka har föreslagits ha en feromonbindande funktion hos hanliga gnagare (Böcskei, *et al.*, 1992).

Can f 2 mRNA har påvisats med northern blot i framför allt parotisspottkörtel men även i tungvävnad, om än i mindre grad (Konieczny *et al.*, 1997). I samma studie ingick även hud och lever, men i dessa vävnader kunde då inte mRNA för Can f 2 påvisas. Vid användning av RT-PCT/PCR med omvänd transkription har man däremot kunnat påvisa mRNA för Can f 2 i parotis- och mandibularisspottkörtel, hud och tunga (Kamata *et al.*, 2007). I den studien ingick även lever och njure och i dessa vävnader kunde mRNA för Can f 2 inte påvisas. Vid immunoblot med antikroppar mot rekombinant Can f 2 menar Kamata *et al.* (2007) att man lyckats påvisa allergenet i parotisspottkörtel (dock ej i mandibularisspottkörtel), saliv samt extrakt från päls och mjäll. Allergenet har rapporterats ha en molekylvikt av 22-23 kD (Kamata *et al.*, 2007).

Både Konieczny *et al.* (1997) och Saarelainen *et al.* (2004) utvärderade andel IgE-reaktivitet hos hundallergiker mot Can f 1 och Can f 2 och i båda fallen var det inte någon av patienterna som uppvisade IgE-reaktivitet endast mot Can f 2 utan de testade patienterna uppvisade IgE-reaktivitet mot både Can f 1 och Can f 2 eller mot enbart Can f 1.

Can f 4

I en studie där fokus låg på att ta fram och utvärdera rekombinanta former av Can f 1 och Can f 2 i allergidiagnostiksammanhang sågs IgE-reaktivitet i immunoblotting mot protein av annan molekylvikt än Can f 1 och Can f 2 (Saarelainen *et al.*, 2004). Dels mot ett 70 kD band som man i studien tolkade som serumalbumin, men även mot ett 18 kD band som tolkades kunna utgöra ett då ännu okänt lipokalinallergen (Saarelainen *et al.*, 2004) som senare fick namnet Can f 4. Can f 4 har studerats och sekvenserats vidare och dess tillhörighet bland lipokalinerna stöds även av Matsson *et al.* (2010). Man har sett tecken på att korsreaktivitet skulle finnas mellan Can f 4 och ett ”odorant-binding protein” hos ko och dessa två proteiner har 38-39 % liknande aminosyrasekvens (Matsson *et al.*, 2010).

Aminosyrasekvensen för Can f 4 har också en mindre likhet med bland annat Fel d 4 hos katt och Equ c 1 hos häst. Överensstämmelse i aminosyrasekvens mellan Can f 4 och Can f 1 respektive Can f 2 är inte mer än 24 % respektive 26 %. Rekombinant Can f 4 har även tagits fram (Matsson *et al.*, 2010). Det verkar kunna finnas hundallergiker som uppvisar IgE-reaktivitet endast mot Can f 4 (Matsson *et al.*, 2010). Betydelsen av Can f 4 som allergen baserat på andelen hundallergiker med IgE-reaktivitet mot allergenet skiljer sig mellan olika studier. Enligt Matsson *et al.* (2010) rör det sig om 35 % (mot rekombinant Can f 4) med ImmunoCAP-teknik medan Rytönen-Nissinen *et al.* (2015) rapporterat 46 % respektive 49 % (mot naturligt respektive rekombinant Can f 4) med immunoblot-teknik och 81 % respektive 54 % (mot naturligt respektive rekombinant Can f 4) med ELISA.

Can f 4 har renats fram från kommersiellt tillgängligt extrakt från hundmjäll (Matsson *et al.*, 2010, Rykönen-Nissinen *et al.*, 2015). mRNA för Can f 4 har kunnat isoleras från tungans ytskikt (Matsson *et al.*, 2010).

Can f 6

Lipokalin Can f 6 presenterades som ett nytt hundallergen av Nilsson *et al.* (2012). Genom likhet med gensekvenser för två andra lipokalinallergen, Fel d 4 hos katt och Equ c 1 hos häst, kunde gensekvensen för Can f 6 identifieras och amplifieras. Nilsson *et al.* (2012) lyckades även påvisa Can f 6 i kommersiellt tillgängligt mjällextrakt och den gensekvens som amplifierades användes för att framställa rekombinant Can f 6. I studien uppvisade 38% av hundallergiker IgE-reaktivitet mot Can f 6. Författarna menar att Can f 6 utgör ett viktigt hundallergen baserat på den stora andelen allergiker med IgE-reaktivitet hos allergenet. Nilsson *et al.* (2012) kunde även påvisa IgE-reaktivitet mot Can f 6 hos individer som inte uppvisade IgE-reaktivitet mot Can f 1 som anses vara ett viktigt hundallergen (Saarelainen *et al.*, 2004) och ej heller mot Can f 2. Då likheten i gensekvens hos Can f 6 med Fel d 4 och Equ c 1 är stor, 67,4 % respektive 55,1%, samtidigt som en god korrelation mellan IgE-reaktivitet mot de tre allergenerna kunde uppvisas, menar Nilsson *et al.* (2012) att det finns en god grund för korsreaktivitet mellan dessa tre lipokalinallergen, vilket också kunde påvisas, om än i varierande grad, med hjälp av inhibitions-ELISA.

Molekylvikter för Can f 6 som rapporterats in till WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee är 27 och 29 kD (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2012).

Albumin

Can f 3

Can f 3 utgörs av hundalbumin (Spitzauer *et al.*, 1993, Nilsson *et al.*, 2014a). Albumin syntetiseras i levern. Till dess funktioner hör bland annat transport för fettlösliga substanser så som thyroideahormon och steroidhormoner (Sjaastad *et al.*, 2010). Då albumin utgör en stor del av de proteiner som finns i serum är detta protein också viktigt för det kolloidosmotiska trycket i blodet. Albumin förekommer även extravaskulärt och har exempelvis kunnat detekteras i interstitiell vätska subkutan hos råttor (Aukland & Fadnes, 1973) och hos människa (Ellmerer *et al.*, 2000) samt i skelettmuskel hos människa (Ellmerer *et al.*, 2000), dock i en lägre koncentration än i plasma (Aukland & Fadnes, 1973) respektive serum (Ellmerer *et al.*, 2000). I en studie av distributionen av humant serumalbumin märkt med I¹³¹ hos sågs att albumin lämnar blodbanan och att extravaskulära utrymmen håller 60 % av det albumin som kan flyttas mellan intra- och extravaskulära utrymmen (Rothschild *et al.*, 1955). Det I¹³¹-märkta albuminet kunde då detekteras bland annat i hud (utan subkutan vävnad) och muskel. Rothschild *et al.* (1955) anger att albuminkoncentrationen i hud är hög då den utgör hela 18 % av det albumin som kan flyttas mellan intra- och extravaskulära utrymmen, att jämföra med 40 % i plasma. Enligt Rothschild *et al.* (1955) är detta sannolikt kopplat till att huden har en stor extracellulär vätskevolym. Enligt Berson *et al.* (1953) nås en jämvikt i distributionen av I¹³¹-märkt albumin mellan plasma och extravaskulära utrymmen 4 till 7 dagar efter injektion.

Albumin hos hund (och även andra djurslag) liknar till stora delar humant albumin beträffande struktur och sekvens, men detta till trots kan det fungera som ett allergen och orsaka allergi hos människa (Pandjaitan *et al.*, 2000). Enligt Pandjaitan *et al.* (2000) har hundalbumin en aminosyrasekvens som till 86 % överensstämmer med serumalbumin från katt och till 79 % med humant serum albumin.

Det verkar dock inte som att IgE-reaktivitet mot albumin från ett djurslag innebär IgE-reaktivitet mot albumin från samtliga djurslag och vissa IgE-epitoper verkar vara specifika för de olika albuminerna (Spitzauer *et al.*, 1995). Albuminer verkar dock utgöra en källa för korsreaktivitet som inte kan bortses från (Spitzauer *et al.*, 1995), exempelvis har korsreaktivitet mellan hund- och kattalbumin kunnat påvisas (Pandjaitan *et al.*, 2000).

Andelen hundallergiker som uppvisar IgE-reaktivitet mot hundalbumin har vid senare studier visat sig vara relativt låg, då det uppges röra sig om ca 16 % (Matsson, *et al.*, 2009), till skillnad från de 35 % som tidigare rapporterats av Spitzauer *et al.* (1994).

Förutom att förekomma i serum hos hund har hundalbumin/Can f 3 kunnat påvisas i extrakt från mjäll och päls (Spitzauer *et al.*, 1995, Spitzauer *et al.*, 1993), i saliv (Polovic *et al.*, 2013, Spitzauer *et al.*, 1993), i extrakt från hud, päls, parotis- och mandibularisspottkörtel samt i lever (Spitzauer *et al.*, 1993).

En rekombinant form av hundalbumin har även tagits fram (Pandjaitan *et al.*, 2000). Den molekylvikt hos Can f 3 som rapporterats in till WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee är 69 kDa (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2014b).

Kallikrein

Can f 5

Matsson *et al.* (2009) konstaterade att dog prostatic kallikrein, även kallat arginine esterase (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2014c), som finns i hundars urin utgör ett hundallergen. Detta allergen kom sedan att kallas Can f 5. Den molekylvikt som rapporterats in till WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee är 28 kDa (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2014c). Matsson *et al.* (2009) kunde även påvisa ett protein i extrakt av mjäll från hund vilket var i det närmsta identiskt med Can f 5. Can f 5 liknar ett allergen hos människa kallat prostata-specifikt antigen. Matsson *et al.* (2009) kunde påvisa korsreaktivitet mellan dessa två proteiner. Den hund som användes i studien var en icke kastrerad hanhund. Can f 5 antas produceras i prostata samt har setts minska mycket efter kastration och proteinet antas vara reglerat av androgener (Chapdelaine *et al.*, 1988). En senare studier har visat en tydlig skillnad i koncentration av Can f 5 i urinen mellan icke kastrerade hanhundar och tikar, där tikarna uppvisade en koncentration på eller under den använda metodens detektionsgräns ($<0,001 \mu\text{g/ml}$) när medelvärdet bland de icke kastrerade hanhundarna var $69 \mu\text{g/ml}$ (Åsén, 2010).

Korsreaktivitet mellan Can f 5 och prostata-specifikt antigen hos människa har beskrivits även av Basagaña *et al.* (2012), som studerade ett fall med en kvinna som visat symptom på seminalplasmaallergi (HSPA). Basagaña *et al.* (2012) menar att Can f 5 skulle kunna verka predisponerande för HSPA.

Korsreaktivitet

Enligt Nilsson *et al.* (2014a) tyder preliminära data på att en allergisk individ sällan reagerar på bara ett lipokalinallergen utan de flesta är sensitiserade mot en kombination av två eller fler lipokalinallergen. Det finns dock tecken på att allergi mot endast ett lipokalinallergen kan förekomma (Matsson *et al.*, 2010).

När två allergen har liknande 3D-struktur kan det leda till IgE-medierad korsreaktivitet (Nilsson *et al.*, 2014a). Som nämnts tidigare är lipokaliner en grupp proteiner som kan skilja sig åt sekventiellt men trots detta har en liknande kristallstruktur (Flower, 1996). Detta skulle enligt Nilsson *et al.* (2012) kunna förklara den korsreaktivitet som kunnat ses mellan olika lipokaliner. Nilsson *et al.* (2014a), anger att korsreaktivitet mellan de fyra lipokalinallergenerna hos hund inte verkar förekommer i någon högre grad. Exempel finns dock på korsreaktivitet mellan hundlipokaliner och lipokaliner från andra djurslag, exempelvis mellan Can f 2 hos hund och Fel d 4 hos katt (Madhurantakam *et al.*, 2010) och mellan Can f 6 hos hund, Fel d 4 hos katt samt Equ c 1 hos häst (Nilsson *et al.* 2012). Tecken på korsreaktivitet mellan Can f 4 och ett lipokalinprotein i mjäll hos ko har också rapporterats (Matsson *et al.*, 2010). Värt att nämna är att den sekventiella likheten mellan Can f 2 och Fel d 4 verkar vara låg trots påvisad korsreaktivitet, mindre än 22 % (Madhurantakam *et al.*, 2010).

Som nämnts tidigare förekommer korsreaktivitet mellan albuminer från olika djurslag, exempelvis hund och katt (Pandjaitan *et al.*, 2000). Albuminer är dock så kallade "minor allergens" (Nilsson *et al.*,

2014a) då det exempelvis endast verkar vara 16 % av hundallergiker som uppvisar IgE-reaktivitet mot hundalbumin (Matsson, *et al.*, 2009) och ca 16 % för kattalbumin (van Ree *et al.*, 1999). Nilsson *et al.* (2014a) menar att den korsreaktivitet som beskrivits mellan albuminer har varit varierande. Nilsson *et al.* (2014a) menar också att det kan finnas en koppling mellan albuminers roll som ”minor allergens” och deras sekventiella likhet och föreslår att likheten med humans serumalbumin skulle kunna innebära tolerans mot albumin från andra djurslag.

Undersökta vävnader – histologi och funktion

Hud

Kroppens största organ, huden, har flera viktiga funktioner, däribland skydd mot den yttre miljön och infektiösa agens, värmeregulering, känsel samt produktion av D-vitamin (Mescher, 2013). Huden består av epidermis och dermis samt hypodermis eller subkutis, vilken förbinder huden till underliggande vävnad (Samuelson, 2007).

Epidermis

Epidermis utgörs av ett flerradigt, förhornat/keratiniserat plattepitel bestående av keratinocyter som bygger upp epitelet, men här finns även andra typer av celler så som melanocyter och immunförsvarsceller (Samuelson, 2007). Epidermis delas in i fem regioner eller lager. Cellerna vandrar successivt uppåt för att slutligen stötas av (Ross & Pawlina, 2011). Där huden är behårad är epidermis hos hund inte mer än två till tre cellager/cellrader tjockt, detta inkluderar inte den yttersta regionen där cellerna är helt förhornade (Miller *et al.* 2013). Epidermis är tjockare på nospegel och trampdynor.

Närmast dermis finns stamcellerna i *stratum basale*, vilka delar sig för att förnya epidermis (Mescher, 2013). *Stratum basale* består endast av ett lager med celler vilka är kubiska eller cylinderformade (Ross and Pawlina, 2011, Miller *et al.*, 2013). Progenitorceller finns även längst ned i nästkommande epidermala lager, *stratum spinosum* (Mescher, 2013). Basallamina mellan dermis och epidermis bildas av *stratum basale* och fäster till dermis med hemidesmosomer. Hemidesmosomer fäster också basalcellerna till basalmembranet (Mescher, 2013). Från *stratum basale* och vidare uppåt fäster cellerna i epidermis till varandra med desmosomer (Samuelson, 2007).

Keratiner utgör en del av cytoskelettet i de epidermala cellerna (Mescher, 2013). De är också viktiga för infästningen mellan celler samt mellan celler och basalmembran via desmosomer respektive hemidesmosomer (Miller *et al.*, 2013). Keratinocyterna fäster även in till varandra med hjälp av adherens junctions, vilka binder till aktin istället för keratin inuti cellerna. Olika typer av epitel har olika typer av keratin. Man delar in keratin i två subfamiljer, I och II. En keratinkedja från typ I och en från typ II uttrycks i par hos keratinocyterna. Vilka par som uttrycks varierar bland annat med differentieringsgrad hos keratinocyterna. Bland typ I keratinerna finns cytokeratin 9 till 20 och bland typ II keratinerna finns cytokeratin 1 till 8.

Nästkommande lager är *stratum spinosum* (Mescher, 2013). Det är ett till två cellager tjockt och bestående av kärnförande, kubiska till polyhedrala celler (Miller *et al.*, 2013). På ytan av keratinocyterna i detta lager finns utskott mot intilliggande keratinocyter. Dessa ser ut att länka cellerna till varandra. *Stratum spinosum* är, tack vare de många förankrande strukturerna mellan dess celler, mycket tåligt mot mekaniskt tryck och drag (Samuelson, 2007). Närmast nästkommande lager, *stratum granulosum*, har cellerna i *stratum spinosum* blivit plattare och även ökat i storlek (Ross & Pawlina, 2011).

Keratinocyterna i *stratum granulosum* innehåller keratohyalina granula (Ross & Pawlina, 2011). I granulan finns prekursorproteiner för proteinet filaggrin. Filaggrin kommer i *stratum corneum* att länka samman de keratinfillament som fyller de förhornade keratinocyterna vilka där har förlorat cellkärna och organeller. En annan typ av granula, så kallade lamellära granula (Mescher, 2013). Dessa innehåller lipider vilka bildar ett lipidlager mellan cellerna när de släpps ut och utgör en viktig

vattenbarriär i epidermis (Mescher, 2013, Ross & Pawlina, 2011). Lipiderna kring epidermis celler är viktiga för epidermis funktion men även för dess proliferation och differentiering (Miller *et al.* 2013). *Stratum granulosum* utgörs endast av ett till två cellager i behårad hud (Miller *et al.* 2013) Det är inte alltid detta lager förekommer. *Stratum granulosum*s celler har en förkrympt cellkärna och cellerna är utplattade till formen.

I det yttersta lagret, *stratum corneum*, är keratinocyterna förhornade och platta (Ross & Pawlina, 2011). Den lipidbarriär som bildades från cellerna i *stratum granulosum* kommer successivt att tunnas ut (Samuelson, 2007). Antalet desmosomer mellan cellerna är också färre närmare ytan. Härifrån stöts förhornade keratinocyter av (Mescher, 2013). Cellerna här är döda och har, istället för cellmembran, något som kallas cornified envelope (Miller *et al.* 2013) vilket ger stadga och skydd till cellerna. Cellerna kallas i detta lager corneocyter och omges av ett lipidrikt matrix. Behårad hud har ett tunnare *stratum corneum* än hårlös hud (Miller *et al.* 2013). Corneocyterna innehåller bland annat ämnen som skyddar huden mot solljus. Mycket av *stratum corneum* kan gå förlorat när vävnad prepareras histologiskt. I cryostatsnittade preparat har 47 cellager kunnat registreras som medelvärde hos *stratum corneum* i hud på hundens bål (Lloyd & Garthwaite, 1982: se Miller *et al.* 2013).

Stratum lucidum finns beläget mellan *stratum granulosum* och *stratum corneum* och anses av vissa vara en del av *stratum corneum* (Ross & Pawlina, 2011). Keratinocyterna färgar här blekt eosinofilt och cellkärna och organeller är borta och keratinfilament fyller cytoplasman (Mescher, 2013). Detta tunna, kompakta och döda cellager förekommer inte överallt i huden (Miller *et al.* 2013). Förutom på trampdynor och nospiegel saknas detta lager. Dess rikliga innehåll av proteinbundna lipider skiljer *stratum lucidum* från *stratum corneum* histokemiskt.

Andra celltyper i epidermis

Förutom keratinocyterna finns även andra typer av celler i epidermis. Melanocyter producerar pigment, bland annat eumelanin (brun-svart) eller pheomelanin (gul eller röd-brunt) (Mescher, 2013, Miller *et al.* 2013). De är belägna i hårsäckar och i *stratum basale*, men även i talg- och svettkörtlars utförgångar (Miller *et al.* 2013). Melanocyter har cytoplasmatiska utskott vilka sträcker sig in mellan keratinocyter i *stratum basale* men även i *stratum spinosum* (Mescher, 2013). Melanocyter innehåller granula med melanin, kallade melanosomer. Melanosomer i melanocyternas utskott fagocyteras av intilliggande keratinocyter, inuti vilka melanosomerna placeras runt cellkärnan som skydd mot UV-strålning samtidigt som det gör huden pigmenterad (Samuelson, 2007, Mescher, 2013). Melanosomerna pigmenterar även pälsen (Miller *et al.* 2013). Det är framför allt i *stratum basale* som melaninpigment finns (Miller *et al.* 2013). Pigmentet förekommer dock i hela epidermis hos djur med en mörk hud. Melanocyter deltar även i inflammatoriska reaktioner då de utsöndrar olika cytokiner.

I *stratum spinosum* finns även Langerhans celler (Ross & Pawlina, 2011). Dessa är antigenpresenterande celler som måste specialfärgas för att kunna ses tydligt i hudsnitt, annars ses endast en kraftigt färgad cellkärna omgiven av klar cytoplasma. De har receptorer för både IgE och IgG samt för komplement 3 (Miller *et al.* 2013).

Merkels celler utgör tillsammans med sitt associerade afferenta neuron en mekanoreceptor kallad Merkels korpuskel (Ross & Pawlina, 2011). Merkels celler är placerade strax proximalt om basallamina i epidermis.

Dermis

Epidermis är via ett basalmembran (där basallamina från epidermis är inkluderat (Mescher, 2013)) sammanbundet med dermis, ett skikt av tät, oregelbunden bindväv (Samuelson, 2007).

Basalmembranet består av basallamina samt retikulära lamina (Mescher, 2010). Basallamina byggs upp av kollagen typ IV samt olika glykoproteiner och proteoglykaner, vilka produceras av epidermis celler. Retikulära lamina finns strax under basallamina och består av typ III kollagenfiber och typ VII kollagenfibriller som produceras av underliggande dermal bindväv. En av basallaminas funktioner är att reglera flödet av makromolekyler mellan epitel och bindväv. Dermis förbinder epidermis till

subkutis och ger stöd åt epidermis (Mescher, 2013). Det är även från blodkärl i dermis som syre och näring via diffusion kan nå cellerna i det avaskulära epidermis. Här finns även somatisk sensoriska nerver och autonoma motoriska nerver samt lymfkärl (Miller, *et al.*, 2013). I epidermis finns fria nervändar. Dermis innehåller fibrer av collagen (framför allt typ I, III och V), elastin och reticulin, men även lösliga komponenter som proteoglykaner, glukosaminoglykaner och hyaluronan (Miller *et al.* 2013). Fibroblaster syntetiserar både fibrer och de mer lösliga komponenterna i dermis. Dermis innehåller även glykoproteint fibronektin vilket är involverat i interaktioner mellan celler och matrix samt mellan olika celler i dermis.

Dermis kan hos arter som är mindre behårade eller hårlösa vanligtvis delas in i ett övre papillärt lager och ett undre retikulärt lager. Det papillära lagret består av lösare bindväv och innehåller kärl, nerver samt kollagen typ I och III (Mescher, 2013). Kollagenfibrerna är oregelbundet och luckert arrangerade och de elastinfibrer som finns är tunna (Miller *et al.* 2013). För att öka ytan och förbättra förankringen mellan epidermis och dermis finns i det papillära lagret så kallade dermala papiller på platser där huden är tjockare och utsätts för mer tryck (Samuelson, 2007, Mescher, 2013). Dessa är utskott som omges av motstående utskott i epidermis (Mescher, 2013). Hos hund (och även katt) saknas dock dermala papiller och utskott av epidermis ned i dermis, bortsett från i trampdynor och nosspegel där epidermis också är tjockare (Miller *et al.*, 2013). Man talar därför om ytliga- och djupa dermis hos hund istället för papillära respektive retikulära dermis.

Det retikulära lagret (djupa dermis) är mindre celltätt och består av tätare bindväv med mycket fibrer av kollagen typ I samt elastiska fibrer (Mescher, 2013). Kollagenfibrerna är här tätt och relativt regelbundet arrangerade då de ligger mer parallellt med huden (Miller *et al.* 2013). De finns färre elastinfibrer i detta lager men de är även grövre än i ytliga dermis. Den celltyp det finns mest av i detta lager är fibrocyter (Samuelson, 2007). Det finns även ett fåtal immunförsvarsceller samt fettceller. I detta lager finns även talg- och svettkörtlar, hårfolliklar, kärl och nerver. De immunförsvarsceller som förekommer i dermis är framför allt dendrocyter, vilka fungerar som antigenpresenterande celler, samt mastceller (Miller *et al.*, 2013). Även eosinofiler, neutrofiler, histiocyter, plasmaceller samt lymfocyter förekommer men i mycket liten utsträckning.

Svettkörtlar

Majoriteten av hundens svettkörtlar är så kallade apocrina (Samuelson, 2007). De apocrina körtlarna producerar bland annat feromoner (Ross & Pawlina, 2011) samt antibakteriella substanser som IgA och olika salter (Miller *et al.*, 2013). Hos människa och andra primater är det istället de merocrina (även kallade eccrina) svettkörtlarna som dominerar (Samuelson, 2007). Apocrina svettkörtlar lossar en del av cytoplasman tillsammans med de komponenter som ska utsöndras, medan de merocrina svettkörtlarna endast frisätter det sekretoriska materialet. Andra namn för dessa två olika typer av svettkörtlar är epitrichiala respektive atrichiala (Jenkinson, 1990: se Miller *et al.*, 2013) Utförsgångarna från de apocrina svettkörtlarna har ett två-radigt kubiskt epitel och mynnar i hårsäckarna (Samuelson, 2007) medan de merocrina svettkörtlarna tömmer sig direkt på epidermis yta via svettporer (Mescher, 2013). Den sekretoriska enheten av körteln är tubulär och spolförmad samt omges av myoepiteliala celler (Samuelson, 2007). Beroende av aktivitetsgrad i de sekretoriska cellerna kan de vara kubiska eller cylinderformade, aktiva celler blir högre. Hos hund är graden av aktivitet dock låg, bortsett från de svettkörtlar som finns i deras trampdynor. Dessa är merocrina istället för apocrina. Apocrina svettkörtlar förekommer inte på vare sig nosspegel eller trampdynor (Miller *et al.* 2013).

Talgkörtlar

Talgkörtlar finns i anslutning till hårfolliklarna (Ross & Pawlina, 2011). Dessa körtlar är holocrina, vilket innebär att hela den sekretoriska cellen utsöndras från körteln. Från basalcellerna i körteln uppkommer nya sekretoriska celler via mitos. Dessa fylls gradvis med lipiddroppar samtidigt som cellerna går i apoptos för att slutligen utsöndras i den hårfollikel till vilken talgkörteln är kopplad (Samuelson, 2007). Ett plattepitel utlinjerar talgkörteln utförsgång (Miller *et al.*, 2013). Talg hjälper

hud och päls att bibehålla flexibilitet (Samuelson, 2007), då de hjälper huden att bibehålla fukt (Miller *et al.*, 2013). Talg ger även glans åt pälsen samt har antimikrobiella egenskaper (Miller, *et al.*, 2013). Fettsyror och IgA samt IgG är exempel på antimikrobiella komponenter i talg. Talgkörtlar förekommer där huden är behårad men saknas på nosspegel och trampdynor (Miller *et al.*, 2013).

Hår och hårfolliklar

Hos hund har olika områden av huden olika typer av hår (Samuelson, 2007). Den större delen av kroppen är täckt av primärt- samt sekundärt hår (underull) vilka skiljer åt gällande grovlek och associerade strukturer. De primära- och sekundära hårstråna är arrangerade i grupper med 2-5 primärhår varav ett är centralt placerat och större än de andra (Miller *et al.*, 2013). Runt dessa finns sedan flera sekundära hårstrån. Talgkörtlar finns i anslutning till både primär- och sekundärhår (Miller *et al.*, 2013). De primära håren har också en så kallad arrector pili muskel i anslutning till hårfollikeln, vilken har en del i värmereglering hos hunden (Samuelson, 2007) då de reser hårstrået sett till hudytan (Miller *et al.*, 2013). Dessa utgörs av glatt muskulatur och har även betydelse för sociala signaler samt tömning av talgkörtlar (Miller *et al.*, 2013). De primära hårstråna har även svettkörtlar i anslutning till hårfollikeln, vilket de sekundära hårstråna ofta saknar (Miller, *et al.*, 2013).

Hårstrån produceras i hårfolliklar. Genom dermis och ned i subcutis går invaginationer från epidermis vilket utgör hårfolliklarna (Samuelson, 2007). Vi basen av hårfollikeln finns så kallade matrixceller (Ross & Pawlina, 2011). Keratinproducerande celler i hårstrået och den så kallade inre rotskidan, vilken täcker hårstrået i hårfollikeln, kommer från dessa matrixceller. Cellerna i hårstrået och inre rotskidan keratiniseras successivt, men cellerna fylls med en annan typ av keratin än andra epidermala celler, vilket gör dem hårdare (Samuelson, 2007). Den inre rotskidan består av tre lager (Miller *et al.*, 2013); det tunna kutikel-lagret längst in, det lite tjockare (1-3 cellager) Huxley-lagret i mitten och ett tunt lager ytterst kallat Henleys lager. Inre rotskidan omger hårstået och ligger dikt an den yttre rotskidan, vilken är en förlängning av hudens epidermis (Ross & Pawlina, 2011). Utanför yttre rotskidan finns ett basalmembran som angränsar till ett lager av tät bindväv kallat fibrous root sheath/bindvävsskida (Miller *et al.*, 2013). Vid basen av hårfollikeln finns en dermal papill bestående av lucker bindväv och kärl (Ross & Pawlina, 2011). Denna är sammankopplad med dermis samt omges av matrixceller, vilka ofta innehåller mycket melanin (Miller *et al.*, 2013).

Hårfollikeln delas anatomiskt in i tre delar (Miller *et al.*, 2013); *infundibulum*, *isthmus* samt *inferior segment* längst distalt.

Hårfollikeln bildar och formgjutur hårstrået (Miller *et al.*, 2013). Själva hårstrået består av en inre kärna, medulla, som omges av ett kortex där de pigmenterade celler som ger håret dess färg finns (Miller *et al.*, 2013). Medulla är tunnare i de sekundära håren. Hårstråets yttersta lager kallas kutikel och består av platta celler som ligger omlott med den fria änden utåt mot hårstråets spets. Celler i hårstråets kortex och kutikel är förhornade.

Pälsen får sin färg från melanin på motsvarande sätt som huden pigmenteras, men här finns melanocyterna placerade bland hårsäckens matrixceller (Ross & Pawlina, 2011).

Tunga

Tungans uppgift är att underlätta intag och bearbetning av föda (Samuelson, 2007). Tungan har även en roll i smakupplevelsen via de smaklökar den utrustats med. Tungan består av skelettmuskler vars fibrer är orienterade i flera olika riktningar, samt bindväv (Mescher, 2013). Dess dorsal- och ventralsida skiljer sig åt, då den dorsala ytan är täckt av ett tjockt, förhornat flerradigt plattepitel samt har flertalet utskott, så kallade papiller. (Samuelson, 2007). Papiller kan antingen ha till uppgift att forsla födan längre bak i munhålan, som de filliforma papillerna, eller bära smaklökar som förmedlar smak, som fungiforma papiller, *vallgravspapiller* eller *bladpapiller* (El Sharaby *et al.*, 2014, Samuelson, 2007). *Papilla filliforme* är den papilltyp som täcker större delen av tungan (Ojima, 2001). Hela papillens yta är keratiniserad, men dess bakre del i högre grad än den främre (Iwasaki & Miyata, 1989). De smaklöksbärande papillerna är färre till antalet (Samuelson, 2007). *Papilla vallate*, de

vallgravsformade papillerna, finns på den bakre tredjedelen av tungan i en V formation (El Sharaby *et al.*, 2014). De är cirkulära och omges av en nedsänkning. Smaklökar finns framför allt på sidorna av dessa papiller men även på den apicala ytan, där det även förekommer sekundära, mindre papiller. Smaklökarna är placerade på dorsalsidan av *papilla fungiforme*, men på sidan av *papilla foliate* (Samuelson, 2007). *Papilla fungiforme* är utspridda dels sporadiskt över tungan, men bildar även de en V formation (Ojima, 2001). *Papilla foliate* är placerade långt bak på tungans lateralsidor (Samuelson, 2007).

Smaklökarna är placerade i epitelet och består av gustatoriska celler, stödjeceller och basala stamceller (Mescher, 2013). Cellerna har organiserat sig i en oval formation med mikrovilli från de gustatoriska cellerna riktade apikalt mot den por där smakämnen upplösta i saliv når de sensoriska cellerna (Mescher, 2013). I smaklökens basala delar finns axoner från sensoriska neuron vilka förmedlar smakupplevelsen. Smaklökar har också kunnat påvisas i larynx hos hund (Yamamoto *et al.*, 1997), i mjuka gommen (Liem *et al.*, 1990) samt pharynx (Travers & Nicklas, 1990) hos råtta.

Parotisspottkörtel

En av hundens större spottkörtlar är glandula parotis/parotisspottkörteln (Dyce *et al.*, 2010). Körteln är ett parigt organ som är placerat strax distalt om öronbasen på huvudets bäge sidor. Vardera körteln tömmer sig via en utförsgång vilken mynnar strax intill överkäkens fjärde premolar. Dess sekretion är hos hunden av blandad (mukös och serös) karaktär medan den hos många andra djurslag endast producerar ett seröst, vattning sekret.

Saliven smörjer och mjukgör föda. Munhålan slemhinna hålls även fuktig tack vare salivsekretionen (Tartaglia & Waugh, 2005) vilket är viktigt för slemhinnornas skydd mot infektion (Sjaastad *et al.*, 2010). Här spelar också salivens innehåll av IgA och lysozym en roll (Samuelson, 2007).

Spottkörtlar omges av en kapsel av bindväv (Ross & Pawlina, 2011). De sekretoriska cellerna bildar grupper, så kallade acini. Centralt i acini finns ett litet lumen (Mescher, 2013). Acini omges av bindväv, vilken går in i körteln från den omgivande kapseln (Ross & Pawlina, 2011). Körteln delas in i lobar och ännu mindre lobuler genom stråk av bindväv. Lobulerna består av grupper av acini (Samuelson, 2007). I spottkörteln finns ett grenverk av utförsgångar (Mescher, 2013) som för saliven från acini och vidare ut i munhålan. Utförsgångarna är placerade i de stråk av bindväv som finns i körteln (Ross & Pawlina, 2011).

Då *glandula parotis* är en spottkörtel av blandad karaktär innehåller den grupper av serösa och mukösa sekretoriska celler. Enligt Frappier (2006) finns hos hund endast enstaka mukösa inslag i den i huvudsak serösa körteln. De serösa sekretoriska cellerna är ofta pyramidformade (Mescher, 2013) och innehåller sekretoriska granula i dess apikala delar. Serösa sekretoriska celler har enzymer i sina granula (Samuelson, 2007, Mescher, 2013) vilka ska utsöndras till saliven. De mukösa sekretoriska cellerna är större än de serösa sekretoriska cellerna (Samuelson, 2007). Dess kärna är placerad i cellens basala delar och de sekretoriska cellerna bildar mer en cylinderformad enhet, sett i relation till de serösa sekretoriska cellerna vilka bildar mer sfäriska acini (Mescher, 2013). De är även ljusare med så kallade mucigena granula (Samuelson, 2007, Ross & Pawlina 2011). Dessa innehåller glykoproteiner vilka kallas muciner (Sjaastad *et al.*, 2010). Dessa bildar tillsammans med vatten ett slemmig sekret. För att underlätta passage av saliv från de sekretoriska cellerna finns myoepiteliala celler som platta, små celler runt acini och början av utförsgångarna (Samuelson, 2007).

De utförsgångar som leder saliven från de sekretoriska cellerna och ut i munhålan har ett enkelt lager av epitelceller närmast de sekretoriska cellerna för att sedan bli flerradigt närmare munhålan (Samuelson, 2007, Mescher, 2013).

Saliven förs ut i munhålan via utförsgångar. Närmast acini finns så kallade intercalated ducts. Striated ducts bildas av flera intercalated ducts som strålar samman (Mescher, 2013). Epitelet är kubiskt i intercalated ducts och enskiktat cylindriskt i striated ducts (Frappier, 2006). Striated ducts kan omges

bindväv i mindre mängd, men de finns i körteln parenkym (Ross & Pawlina, 2011). Epitelet i de efterföljande utförsångarna förändras allt eftersom de närmar sig munhålan. De löper i bindväven mellan lobuler och lobar och går från enskiktat kubiskt via flerradigt kubiskt och flerradigt cylinderepitel (Ross & Pawlina, 2011) till att bli ett flerradigt plattepitel närmast munhålan (Mescher, 2010). Både de sekretoriska delarna och utförsångarna är väl kärl- och nervförsörjda. Även kring de små sekretoriska ändstyckena finns kapillärer.

MATERIAL OCH METODER

Insamling av vävnadsprover

Vävnadsprover för immunohistokemisk analys samlades in från nyligen avlivade hundar på Universitetsdjursjukhuset, Sveriges lantbruksuniversitet i Uppsala, detta efter skriftligt medgivande från djurägarna att deras hund efter avlivning fick användas i forsknings- och undervisningssyfte. Provinsamling ägde rum från mars 2015 till och med oktober 2015. Ingen exklusion baserat på ras, kön, ålder eller eventuell sjukdom användes, detta för att underlätta insamlingen av provmaterial. Totalt samlades prover från 15 hundar, varav en hund användes i en första testkörning och därmed inte ingår i resten av studiematerialet. Provtagna hundar var av raserna Irländsk varghund, Nova scotia duck tolling retriever, Sankt Bernhardshund, Schäfer (2), Leonberger, Flat coated retriever, Rottweiler (2), Whippet, Chinese crested hairless, Pointer, Bichon frisé, Hovawart och Rat terrier, i åldrarna 2 till 12 år varav sju tikar (samtliga intakta) och åtta hanhundar (varav sex intakta). Vävnadsproverna togs ut med skalpell och de vävnader som provtogs var hud från kraniala ryggområdet på hundens högra sida, tunga från lateralt på dess mittersta del samt parotisspottkörtel. Även nospiegel, trampdyna, lever och skelettmuskel provtogs men användes inte vidare i denna studie. I studien ingick vävnadsprover från tunga och hud från 14 hundar samt parotisspottkörtelvävnad från 10 hundar.

Vävnadsprover från tunga och parotisspottkörtel (samt resterande prover bortsett från hud) placerades i flytande kväve direkt efter att de skurits ut från hunden i fråga. Därefter förvarades proverna i en frys som höll -80°C innan snittning i kryostat.

På grund av svårigheter att i kryostat snitta vävnadsprov från hud togs beslutet att istället fixera dessa vävnadsprover i paraformaldehyd (4 %) för att möjliggöra senare paraffininbäddning och därmed underlätta snittning. Hudproverna placerades i paraformaldehyd direkt efter att proverna skurits ut från hunden i fråga. Därefter förvarades vävnadsproverna i paraformaldehyd i kylskåp under 24 timmar, varefter hudbitarna sköljdes i PBS och sedan förvarades i PBS i kylskåp. Innan vidare bearbetning med efterföljande paraffininbäddning placerades proverna i etanol (70 %). Förvaringstid i PBS i kylskåp kunde uppgå till 92 timmar men endast ca 3-20 timmar i de flesta fall. De paraffininbäddade vävnadsbitarna förvarades i rumstemperatur före och efter snittning i mikrotom. Då beslutet att fixera hudbitarna i paraformaldehyd togs när 6 hundar (7 inkluderande den hund som användes till testkörning) redan provtagits, tinades hud från dessa hundar försiktigt upp till rumstemperatur, varpå de lades i paraformaldehyd och vidare hanterades som beskrivits ovan.

Snittning och immunohistokemisk färgning

De paraffininbäddade vävnadsproverna från hud snittades med mikrotom i 4 µm tjocka snitt. Ett fåtal snitt var 5 µm på grund av svårigheter att åstadkomma hela snitt. Innan följande immunohistokemisk färgning påbörjades utfördes en deparaffinisering av hudsnitten i xylen samt efterföljande graderad alkoholserie.

De frysfixerade vävnadsproverna från tunga och parotisspottkörtel snittades i 10 µm tjocka snitt i en kryostat som höll -20°C. Innan snittning placerades vävnadsproverna i kryostaten > 30 minuter innan snittningen påbörjades. Detta för att vävnadsproverna skulle nå -20°C innan snittning. I samband med snittning hölls de färdiga snitten i rumstemperatur 10-60 minuter. Snitten applicerades på objektsglas (VWR Superfrost Plus Micro Slide, VWR International, West Chester, USA) och förvarades i vanlig frys (-20°C) fram till immunohistokemisk färgning.

För den immunohistokemiska färgningen användes Vectastain Elite Mouse IgG ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) där proteasaktivitet används för att detektera de sekundära antikropparna. Snitten tilläts lufttorka i ca 30 minuter. ImmEdge hydrophobic barrier pen (Vector Laboratories, Burlingame, USA) applicerades kring snitten. Till hud från hund 11 och 13 samt neutralisering/blockering av Can f 1 och Can f 3 i tunga respektive hud användes dock Dako Pen (Dako, Glostrup, Danmark). Därefter rehydrerades snitten med PBS under 5 minuter. Blocking serum (normal serum från ABC Kit) i buffert (PBS, blandat motsvarande 150 µl normal serum till 10 ml PBS) applicerades på snitten följt av inkubering i mörker samt rumstemperatur i fuktbevarande behållare under 30 minuter. Blocking serum/normal serum hälldes bort från snitten. Därefter tillsattes den primära antikroppen (monoklonala mus IgG mot de aktuella allergenen, se rubrik ”monoklonalantikroppar och kontroller”) varpå snitten inkuberades i mörker samt fuktbevarande behållare i 4°C över natt. Snitten tvättades därefter med PBS genom försiktig sköljning med PBS över glaset följt av 5 minuter tvätt i kyvett fylld med PBS på försiktig skak, tvätt utfördes i 3 omgångar och PBS byttes mellan de tre tvättningarna. Den sekundära antikroppen (ABC kit) blandades motsvarande 150 µl normal serum, 10 ml PBS samt 50 µl av den biotinylerade sekundära antikroppen, varpå den applicerades på snitten följt av inkubering i mörker samt fuktbevarande behållare i rumstemperatur under 30 minuter. Snitten tvättades i PBS enligt beskrivning ovan. 0,3 % väteperoxid i metanol användes för att blockera endogena peroxidaser i snitten, detta under inkubering i mörker samt fuktbevarande behållare i rumstemperatur under 30 minuter. Snitten tvättades med PBS enligt beskrivning ovan. Därefter inkuberades snitten med ABC reagent (ABC Kit) i mörker samt fuktbevarande behållare under 30 minuter. ABC reagent innehöll avidin DH (reagent A), biotinylerad peroxidase H (reagent B) blandat med PBS. 100 µl reagent A blandades med 5 ml PBS samt 100 µl reagent B och tilläts stå i mörker minst 30 minuter innan användning. Detta åtföljdes av ytterligare en tvätt i PBS enligt ovan. Därefter utfördes färgning för detektion med DAB (3-3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride, Sigma, St. Louis, USA) till önskad intensitet, ca 10 minuter för hudsnitt och 3-3,5 minuter för snitt från tunga och parotisspottkörtel, varpå snitten sköljdes i kranvatten följt av motfärgning med hematoxylin och sköljning i kranvatten. Därefter monterades snitten i en glycerol och gelatin-blandning (Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt, Tyskland) och tilläts lufttorka mörkt och plant över natt. Snitten förvarades därefter mörkt i rumstemperatur.

I samband den immunohistokemiska färgningen hölls snitten i rumstemperatur uppskattningsvis 7-8 timmar innan de monterades med glycerol och gelatin-blandning. Under inkuberingen över natt med primärantikroppar förvarades snitten i 4°C.

Den DAB-lösning som användes bestod av 15 ml Tris buffered saline, 12 µl 30 % väteperoxid samt 1 tablett 3-3' diaminobenzidinetetrahydrochloride. Lösningen förvarades i behållare täckt av aluminiumfolie under tillredningen.

I de fall där hundar inte uppvisade en DAB-detektion som kunde förväntas baserat på resultat från tidigare utförda immunohistokemiska färgningar i denna studie, genomfördes en andra körning på berörda glas från dessa hundar (hund 5, 11 och 15).

Monoklonalantikroppar och kontroller

De primärantikroppar som användes tillhandahölls av Markus Back och Hans Grönlund, Karolinska Institutet i Stockholm. De primärantikroppar som användes var monoklonala mus IgG mot rekombinant Can f 1 och Can f 2 samt naturligt Can f 3. Antikropparna framställdes vid Karolinska institutet där fusion av musmyelomceller med mussplenocyter användes för att ta fram cellkulturer med hybridom vilka producerade monoklonalantikropparna mot de aktuella allergenen. Mjältarna som användes för extraktion av splenocyter togs från möss vilka först injicerades med de aktuella allergenen. Antikropparna förvarades i -20°C efter leverans.

Samtliga antikroppar späddes 1:500 i PBS med 0,1 % BSA (bovint serum albumin), följt av vortex och centrifugering (10 minuter, 300 g, 4 °C). Antikropparna hölls på is under tillredning av spädningarna.

Koncentrationen på antikropparna var inte känd då den inte uppmättes av de kontaktpersoner vid Karolinska Institutet som tillhandahöll antikropparna.

Som negativa kontroller användes dels Mouse IgG1 (0,1 mg/ml, MG100, life technologies, Thermo Fisher scientific/invitrogen, Frederick, USA) som späddes 1:500 med PBS och 0,1 % BSA, samt en blank negativ kontroll med endast PBS och 0,1 % BSA. Fortsättningsvis kommer den negativa kontrollen med mus IgG benämnas som mus IgG och den blanka negativa kontrollen kommer att benämnas som negativ kontroll.

Neutralisering av anti-Can f 1 i tunga samt anti-Can f 3 i hud

Can f 1

Rekombinant Can f 1 (tillhandahölls av kontaktpersoner vid Karolinska Institutet i Stockholm, se ovan) tillsattes i två olika spädningar (0,5 µl respektive 4 µl av 4,8 mg/ml antigen) till 500 µl av PBS + 0,1 % BSA samt anti-Can f 1 i en spädning av 1:500. De färdigblandade lösningarna vortexas samt centrifugerades (2 minuter, 300 g, 4 °C) varpå de tilläts blanda sig över natt, mörker, 4 °C. Därefter hanterades lösningarna som primärantikroppar i körschemat för immunohistokemisk färgning enligt ovan.

Can f 3

Naturligt Can f 3 (tillhandahölls av kontaktpersoner vid Karolinska institutet i Stockholm, se ovan) tillsattes i två olika spädningar (0,5 µl respektive 4 µl av 6,8 mg/ml antigen) till 500 µl av PBS + 0,1 % BSA samt anti-Can f 1 i en spädning av 1:500. De färdigblandade lösningarna vortexas samt centrifugerades (2 minuter, 300 g, 4 °C) varpå de tilläts blanda sig över natt, mörker, 4 °C. Därefter hanterades lösningarna som primärantikroppar i körschemat för immunohistokemisk färgning enligt ovan.

RESULTAT

Hud

I snitt från majoriteten av de studerade hundarna var paraformaldehydfixeringen lyckad i avseende på bevarande av vävnadens struktur. Hos ett fåtal av de hundar där hudbitarna ej direktfixerats var vävnadens struktur mer påverkad av hanteringen vilket medförde att DAB-detektion varit svårare att bedöma gällande vissa folliklar och adnexastrukturer.

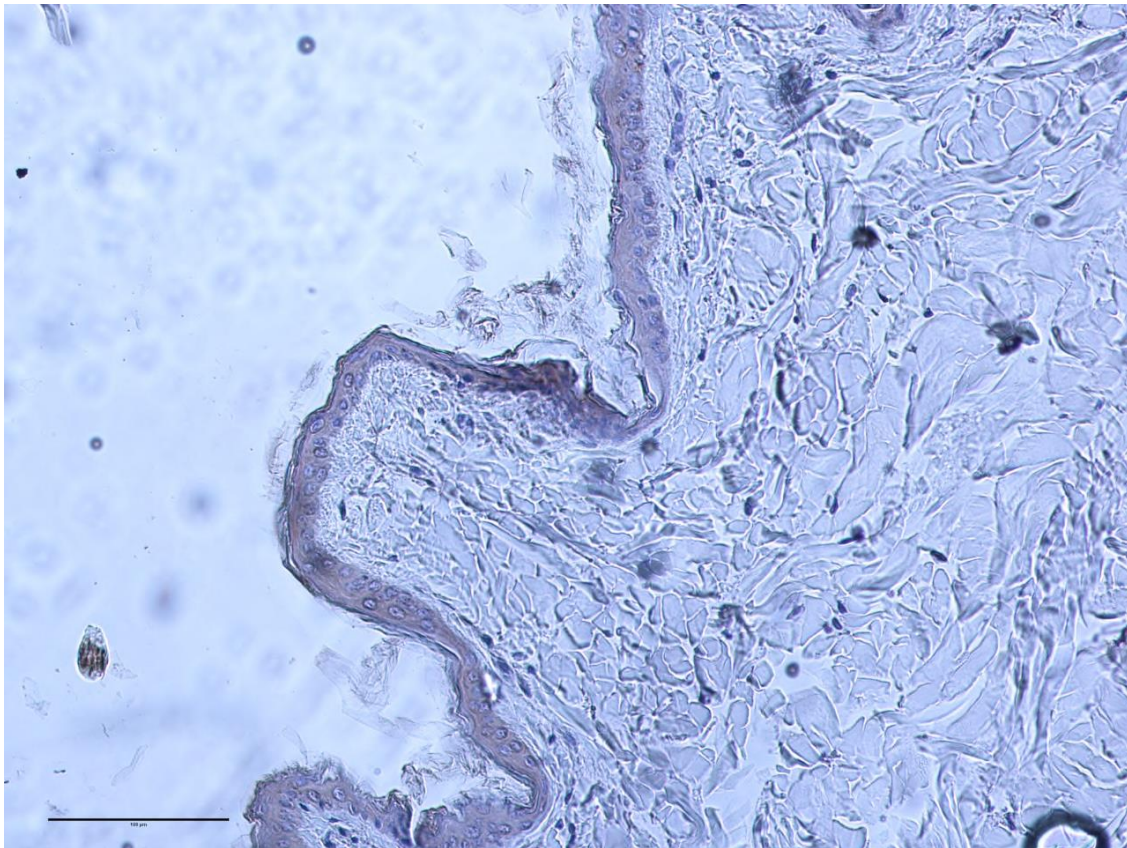
Can f 1

Med anti-Can f 1 kunde en svag men ändå synlig DAB-detektion ses i viabla epidermis (4/14, se figur 1), stratum corneum (2/14) samt hårfollikelceller (5/14, se figur 2). Hos ett fåtal hundar kunde även en svag tendens till detektion anas i en del lokalisationer, se tabell 1 samt figur 3. Figur 4, 5, 6 och 7 visar exempel på utseendet hos de kontroller som användes.

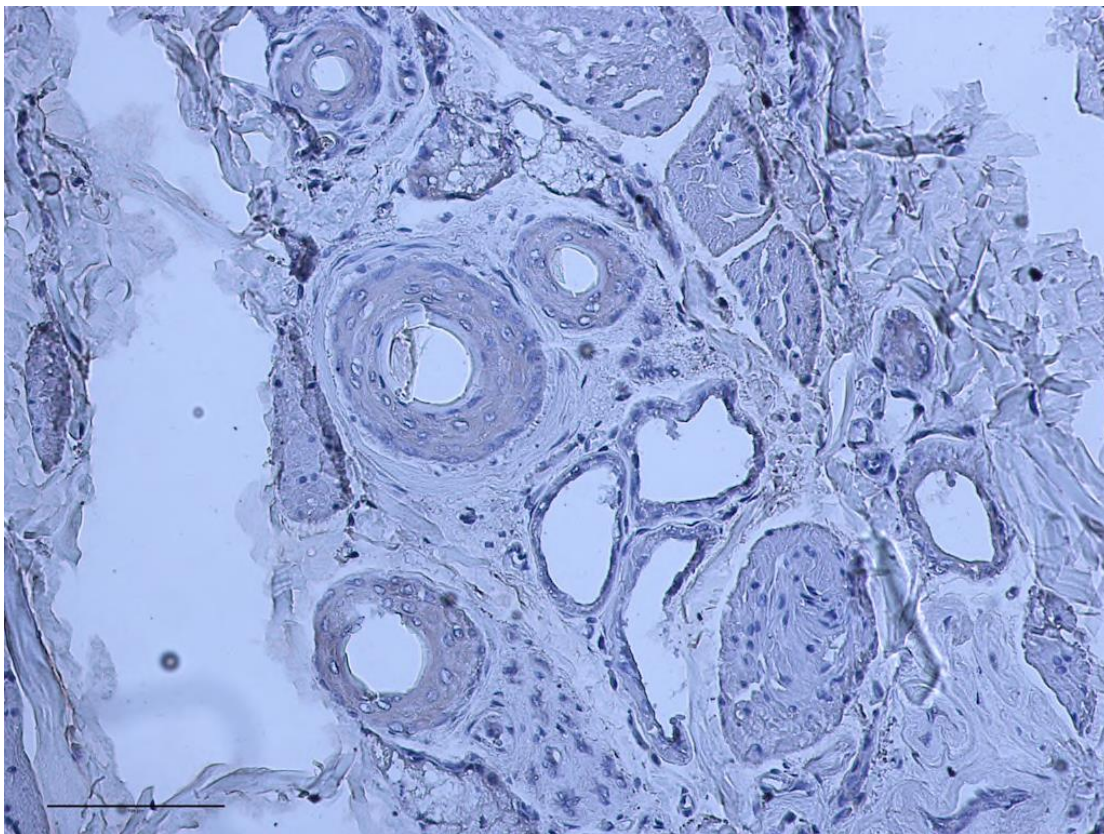
Samtliga hundar som där DAB-detektion kunde ses enligt ovan sakade motsvarande detektion i kontroller. Bland de hundar där en tendens till detektion kunde anas fanns dock motsvarande detektion respektive tendens till detektion hos mus IgG-kontrollen i bindväv i dermis (1/1) respektive stratum corneum (1/5).

Tabell 1. *Can f1 i hud. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

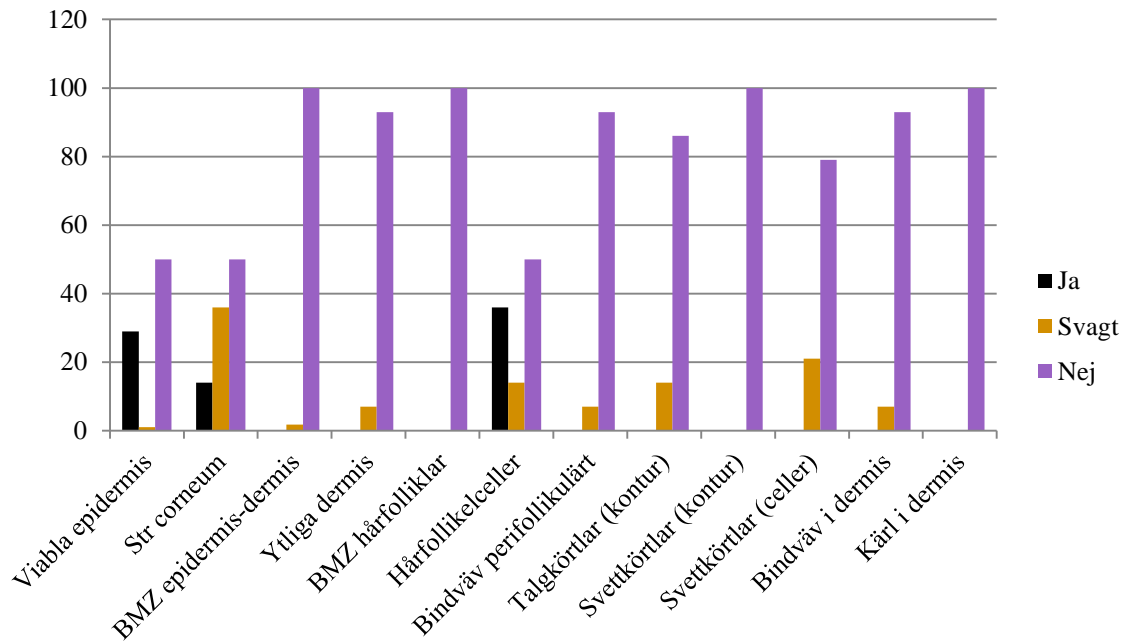
Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Viabla epidermis	4 (29 %)	7 (50 %)	3 (21 %)	14
Str corneum	2 (14 %)	7 (50 %)	5 (36 %)	14
BMZ epidermis-dermis	0	14 (100 %)	0	14
Ytliga dermis	0	13 (93 %)	1 (7 %)	14
BMZ hårfolliklar	0	14 (100 %)	0	14
Hårfollikelceller	5 (36 %)	7 (50 %)	2 (14 %)	14
Bindväv perifollikulärt	0	13 (93 %)	1 (7 %)	14
Talgkörtlar (kontur)	0	12 (86 %)	2 (14 %)	14
Svettkörtlar (kontur)	0	14 (100 %)	0	14
Svettkörtlar (celler)	0	11 (79 %)	3 (21 %)	14
Bindväv i dermis	0	13 (93 %)	1 (7 %)	14
Kärl i dermis	0	14 (100 %)	0	14



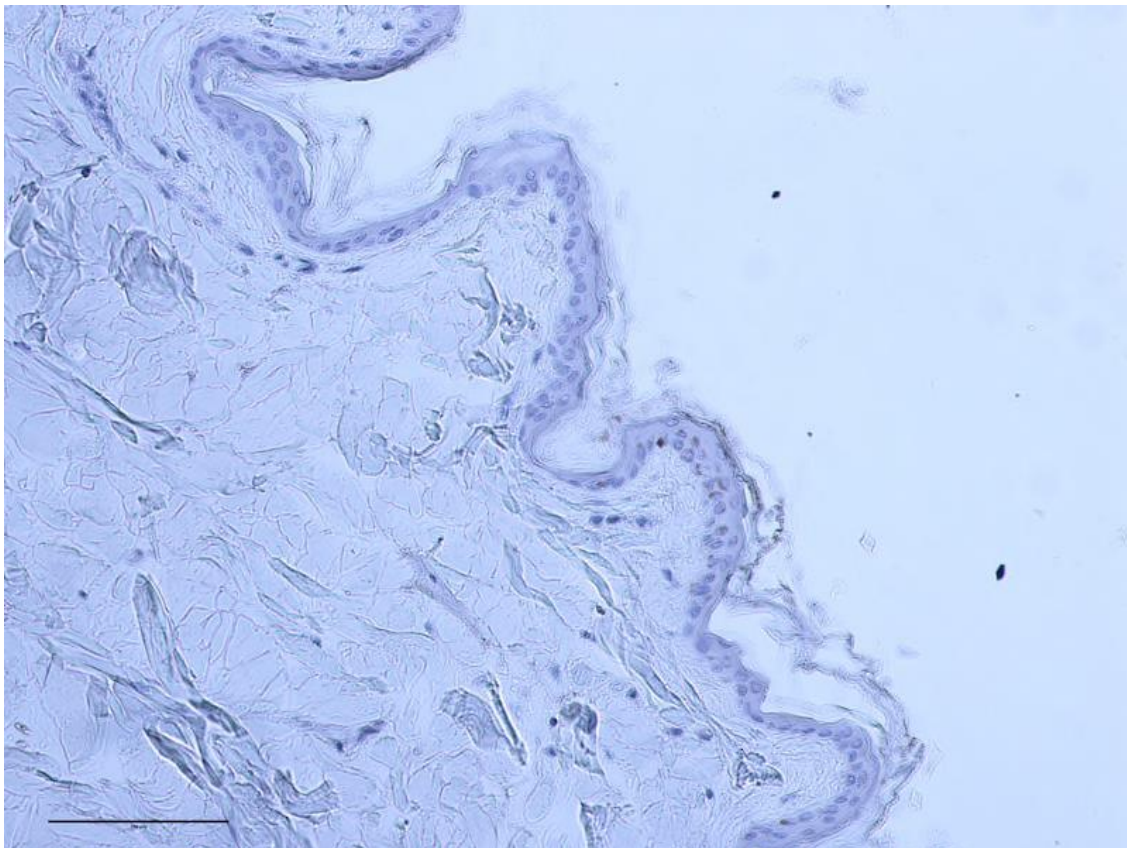
Figur 1. *Can f 1 i hud från hund nr 8. Visar DAB-detektion i viabla epidermis.*



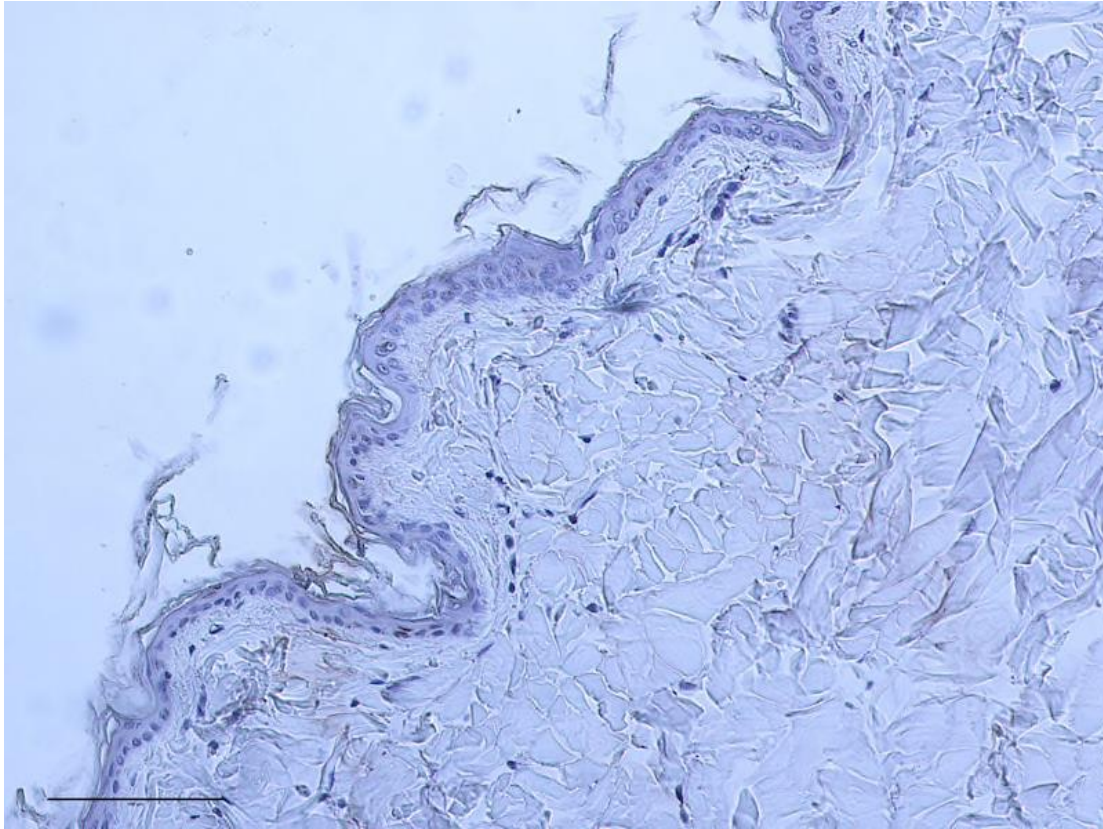
Figur 2. *Can f 1 i hud från hund nr 12. Visar DAB-detektion i hårfollikelceller.*



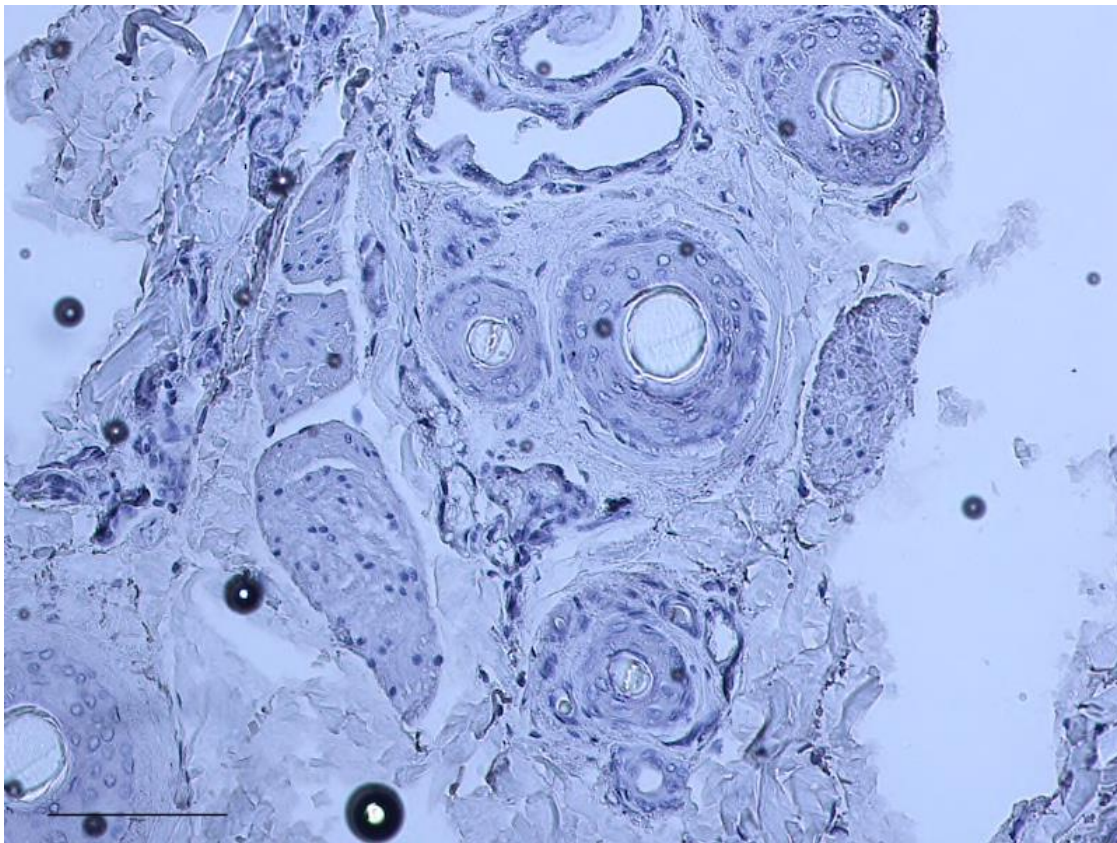
Figur 3. *Can f 1* i hud. Anger DAB-detektion med anti-*Can f 1* i respektive del av huden (% av 14 hundar).



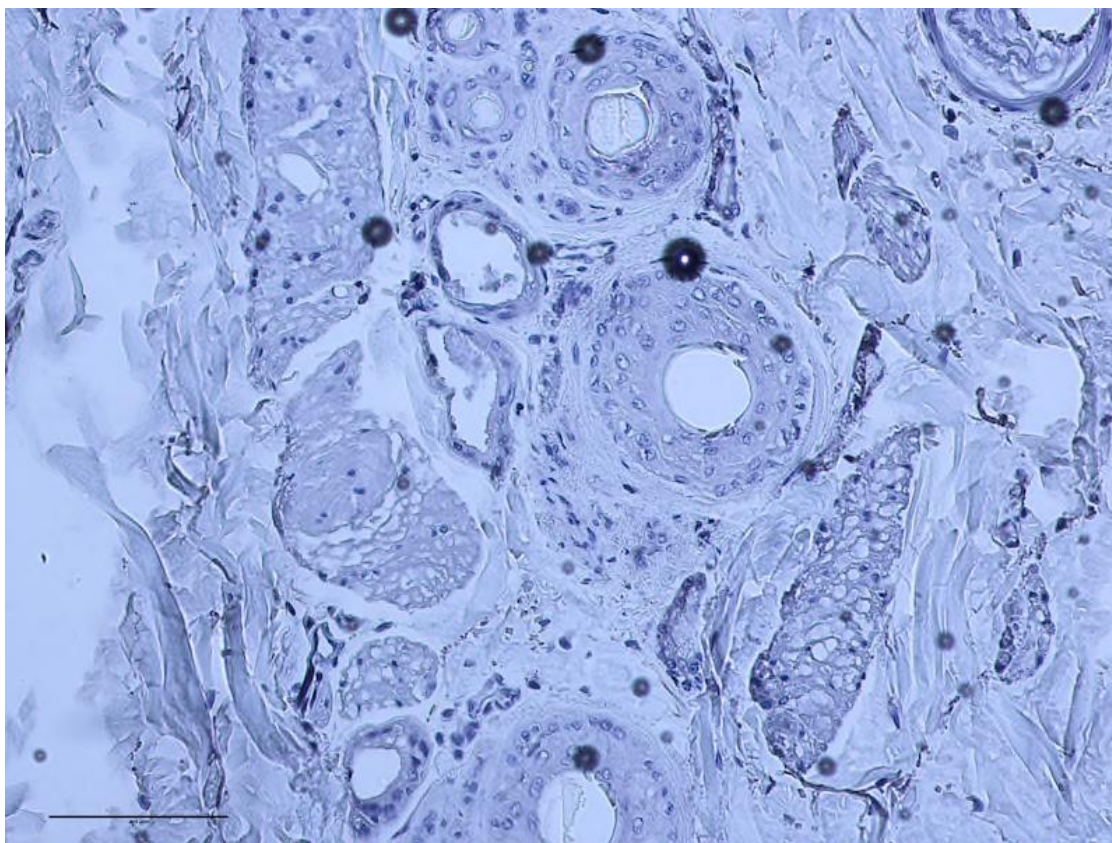
Figur 4. *Mus IgG* kontroll i hud från hund nr 8. Visar viabla epidermis.



Figur 5. *Negativ kontroll i hud från hund nr 8. Visar viabla epidermis.*



Figur 6. *Mus IgG kontroll i hud från hund nr 12. Visar hårfolliklar.*



Figur 7. Negativ kontroll i hud från hund nr 12. Visar hårfolliklar.

Can f 2

Antikroppen anti-Can f 2 gav en svag DAB-detektion i ytliga dermis hos 1 av 14 hundar. En svag tendens till DAB-detektion i viabla epidermis kunde anas hos 2 av 14 hundar. Samtliga dessa hundar saknade motsvarande detektion i kontroller.

Can f 3

Den mest tydliga DAB-detektionen i huden kunde ses i de snitt där anti-Can f 3 användes som primärantikropp. Det fanns en tydlig skillnad i den mängd DAB-detektion som kunde ses med anti-Can f 3 jämfört med anti-Can f 1, anti-Can f 2 samt negativa kontroller. Överlag sågs ett tydligt mönster med DAB-detektion i bindväv, vilken blev starkare där bindväven bildar kapslar/ytskikt på strukturer i dermis, exempelvis kring hårfolliklar, talg- och svettkörtlar.

Anti-Can f 3 gav upphov till detektion i viabla epidermis (13/14 se figur 8), stratum corneum (4/14), konturen av talgkörtlar (13/14), konturen av svettkörtlar (13/14), celler i svettkörtlar (5/14), bindväv i dermis (13/14) samt kärl i dermis (12/14). Samtliga 14 hundar uppvisade DAB-detektion i basalmembran mellan epidermis och dermis, ytliga dermis, basalmembran runt hårfolliklar, hårfollikelceller samt bindväv perifollikulärt, se figur 8 samt figur 9.

Den detektion som kunde ses i viabla epidermis varierade både i omfattning och intensitet mellan de olika hundarna och tenderade att vara starkare i snitt från de hundarna vars hud ej direktfixerades. Detta gäller 5 av dessa 6 hundar. Detektionsintensiteten varierade även i basalmembran mellan epidermis och dermis samt den mest ytliga delen av dermis. Här kunde dock inte någon skillnad mellan direktfixerade och icke direktfixerade preparat ses.

Kring hårfolliklar i snitt från 4 hundar kunde en upplarnad zon ses i basalmembran runt hårfolliklarna istället för den detektion som oftast kunde ses. Detta berörde dock aldrig samtliga hårfolliklar hos de hundar där detta kunde noteras.

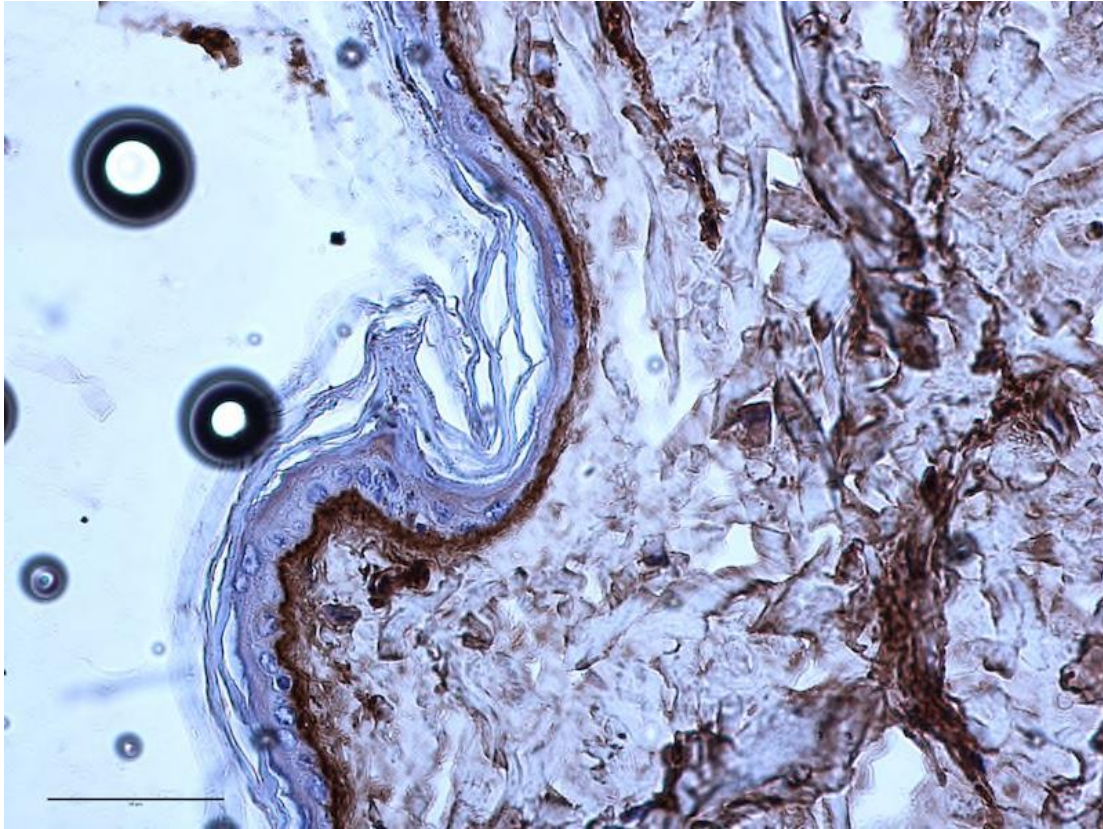
Den detektion som kunde ses i stratum corneum hos en del hundar var endast av mindre grad och omfattande endast enstaka stråk av förhornade celler.

En svag tendens till detektion kunde även anas hos ett fåtal hundar i en del lokalisationer, se tabell 2 samt figur 10.

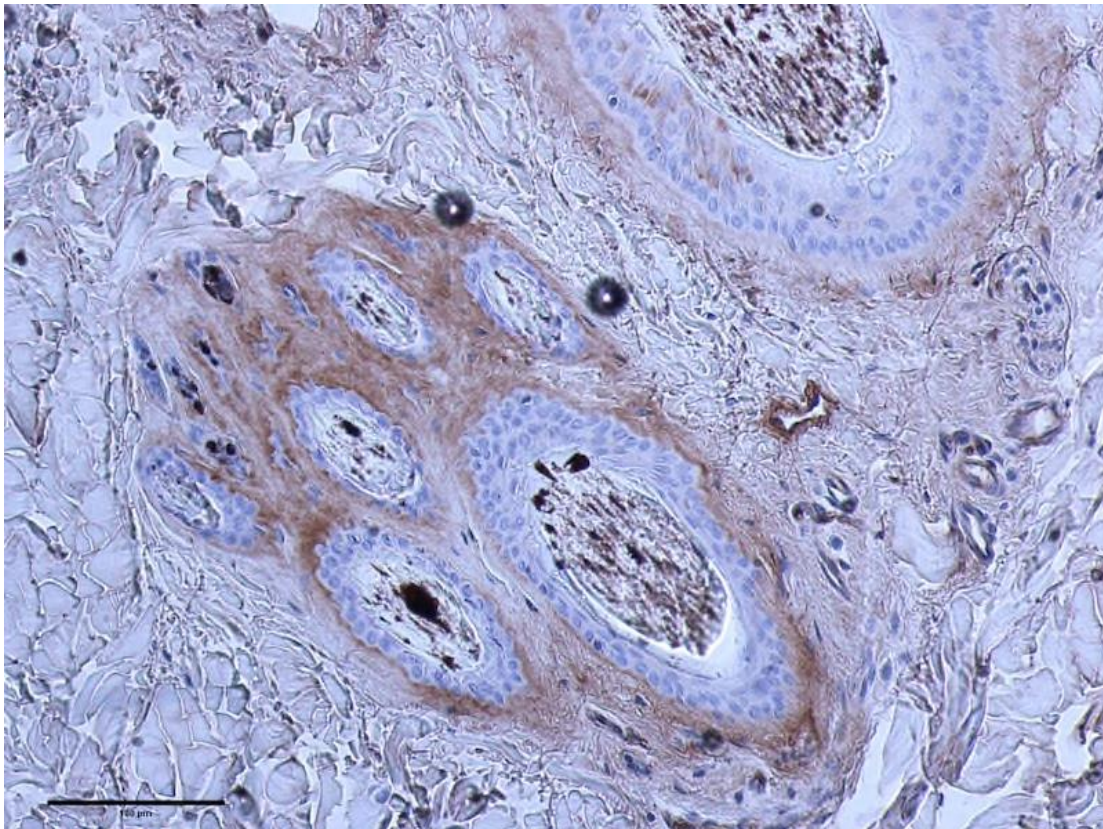
Hos de hundar där en tydlig DAB-detektion kunde ses enligt ovan, saknade de flesta hundar motsvarande detektion i kontroller. Hos 1 av 4 hundar uppvisade dock även den negativa kontrollen en tendens till detektion i stratum corneum. En svag tendens till detektion kunde anas med mus IgG-kontrollen hos 1 av 13 hundar med detektion i bindväv i dermis. Hos 1 av 5 hundar som uppvisat svag tendens till detektion i stratum corneum kunde motsvarande tendens till detektion anas hos mus IgG-kontrollen.

Tabell 2. *Can f 3 i hud. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

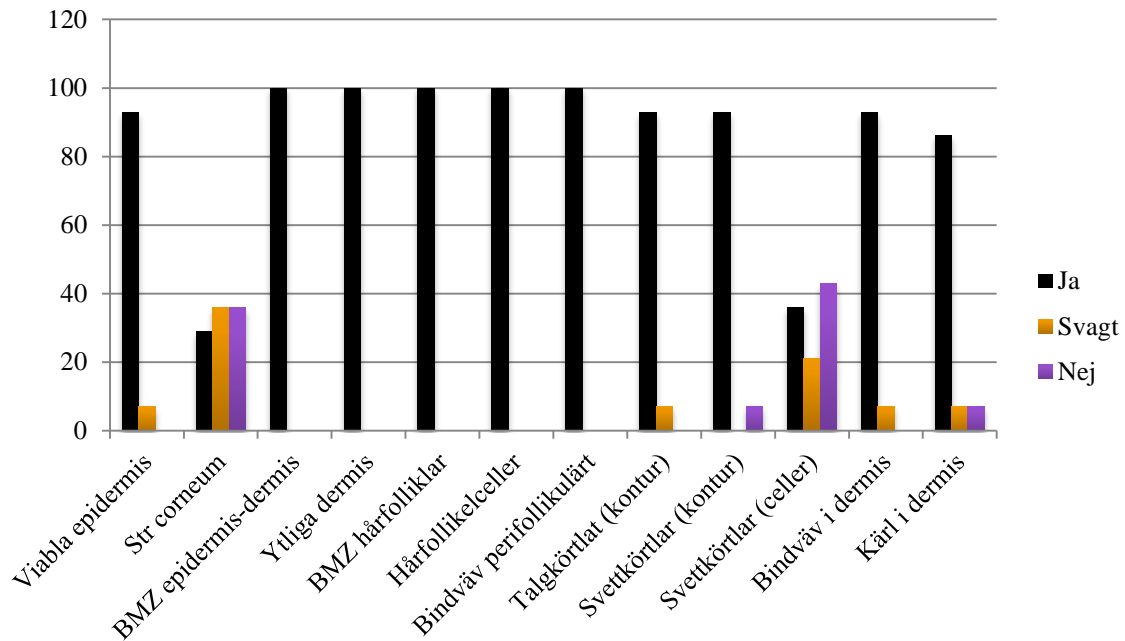
Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Viabla epidermis	13 (93 %)	0	1 (7 %)	14
Str corneum	4 (29 %)	5 (36 %)	5 (36 %)	14
BMZ epidermis-dermis	14 (100 %)	0	0	14
Ytliga dermis	14 (100 %)	0	0	14
BMZ hårfolliklar	14 (100 %)	0	0	14
Hårfollikelceller	14 (100 %)	0	0	14
Bindväv perifollikulärt	14 (100 %)	0	0	14
Talgkörtlar (kontur)	13 (93 %)	0	1 (7 %)	14
Svettkörtlar (kontur)	13 (93 %)	1 (7 %)	0	14
Svettkörtlar (celler)	5 (36 %)	6 (43 %)	3 (21 %)	14
Bindväv i dermis	13 (93 %)	0	1 (7 %)	14
Kärl i dermis	12 (86 %)	1 (7 %)	1 (7 %)	14



Figur 8. *Can f 3* i hud från hund nr 12. Visar DAB-detektion i viabla epidermis samt basalmembranzonen mellan epidermis och dermis.



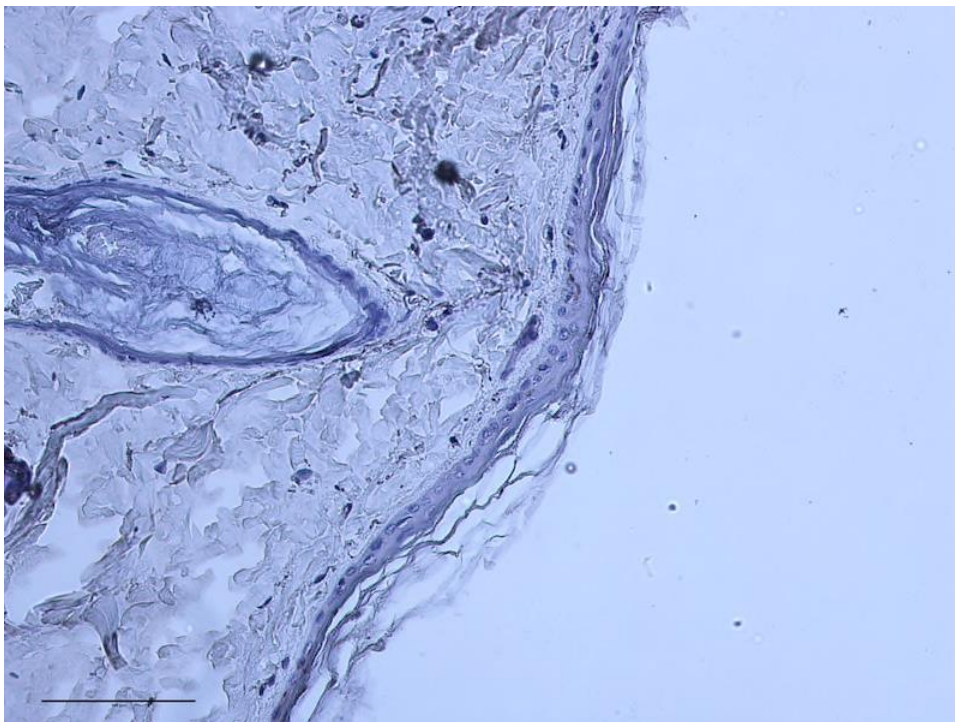
Figur 9. *Can f 3* i hud från hund nr 8. Visar DAB-detektion i hårfollikelceller, basalmembranzoner kring hårfolliklar samt i perifollikulär bindväv.



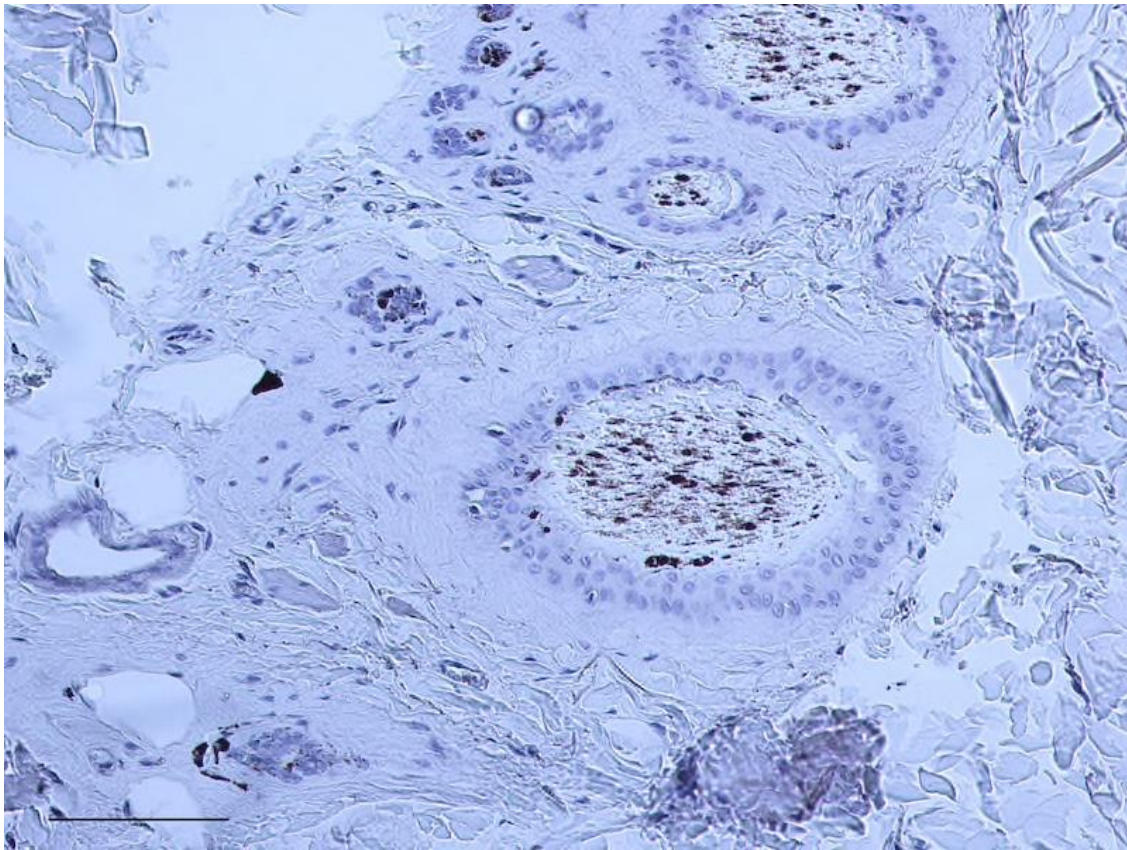
Figur 10. *Can f 3* i hud. Anger DAB-detektion med anti-*Can f 3* i respektive del av huden (% av 14 hundar).

Mus IgG kontroll samt negativ kontroll

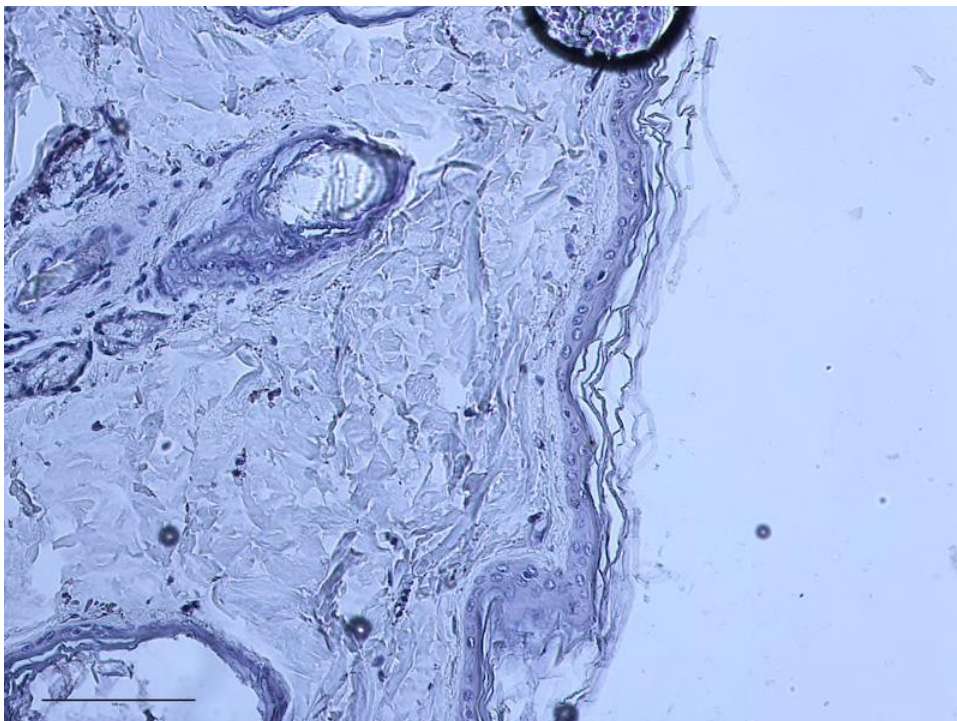
Samtliga kontrollsnitt saknade tydlig DAB-detektion. I stratum corneum och bindväv i dermis kunde dock en svag tendens till DAB-detektion anas i två (en mus IgG och en negativ kontroll) respektive ett fall. Figur 11 och figur 12 visar exempel på resultatet för mus IgG kontrollen, medan figur 13 och figur 14 visar exempel på resultatet för den negativ kontrollen.



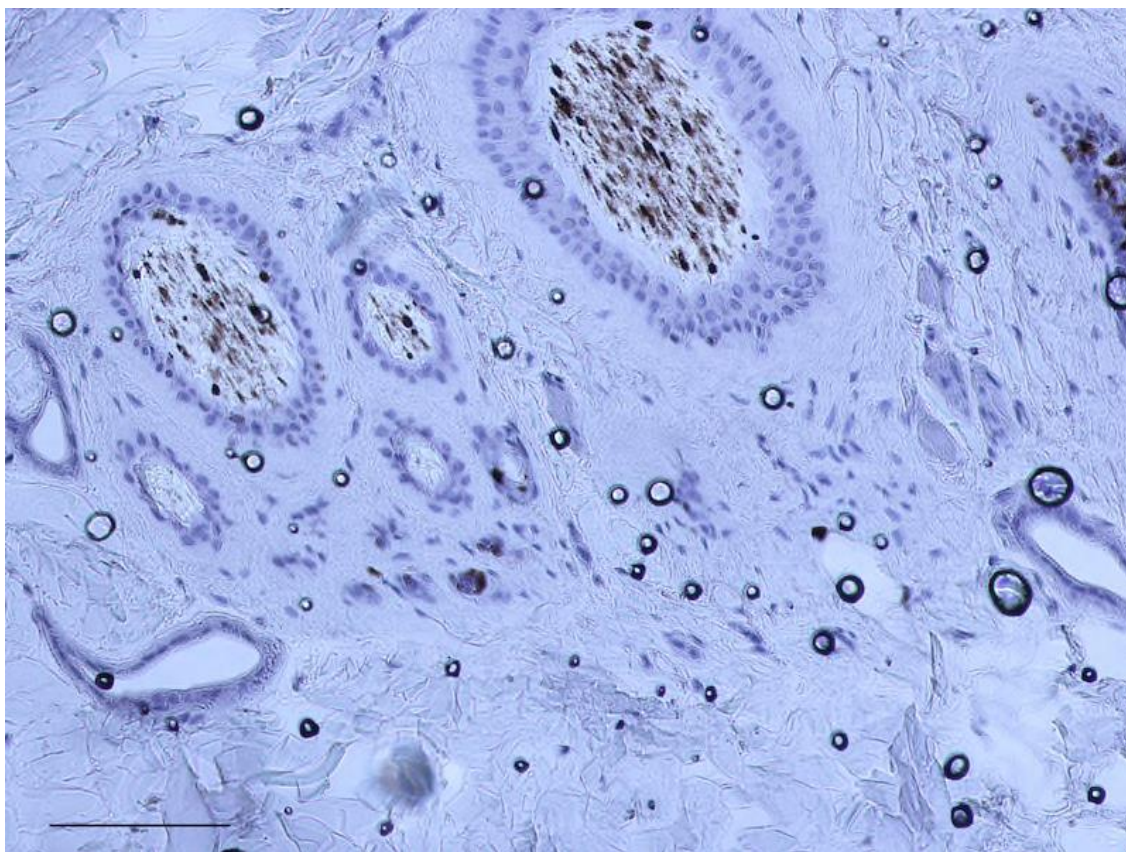
Figur 11. *Mus IgG* kontroll i hud från hund nr 12. Visar viabla epidermis.



Figur 12. *Mus IgG kontroll i hud från hund nr 8. Visar hårfolliklar.*



Figur 13. *Negativ kontroll i hud från hund nr 12. Visar viabl epidermis.*



Figur 14. *Negativ kontroll i hud från hund nr 8. Visar hårfolliklar.*

Tunga

Can f 1

En tydlig skillnad kunde ses mellan de snitt där anti-Can f 1 användes som primärantikropp och samtliga övriga antikroppar samt kontroller. Detta var en DAB-detektion i tungans dorsala epitellager, se tabell 3, figur 15 samt figur 16, vilken kunde ses hos 13 av 14 hundar. Detektionen kunde ses i papillbaser samt mellan papiller (12/13), endast mellan papiller (1/13). Basalcellagret i epitelet saknade helt detektion (13/13) men detektionen sträckte sig upp till epitelets yta mellan papillerna (13/13). Hos 8 hundar sågs även stråk av detektion högre upp i papillerna. DAB-detektion av varierande grad ses i den yttersta delen av det förhornade epitelet (14/14).

I snitt från 2 hundar (hund 5 och hund 11) kunde ovan beskrivna DAB-detektion i epitelet ses först vid en andra körning med snitt från samma hundar.

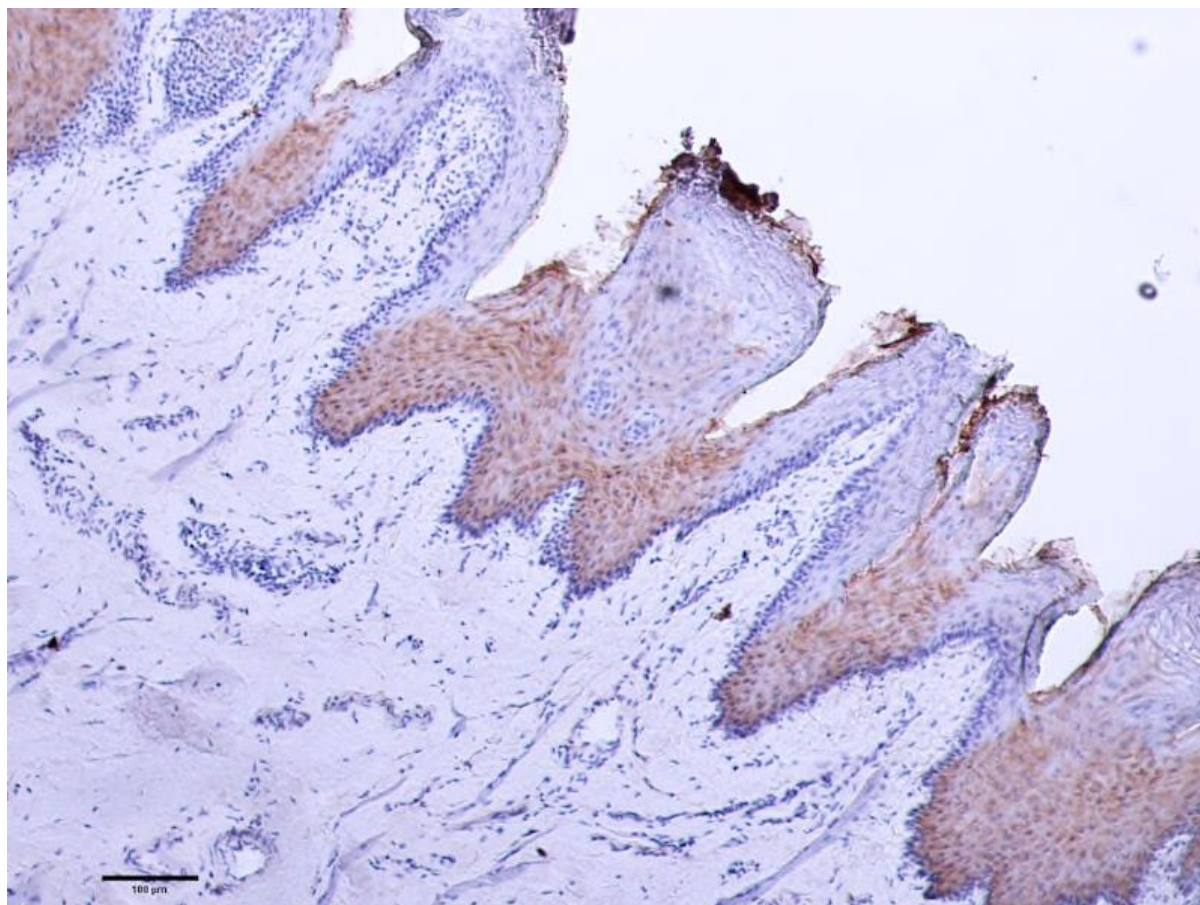
DAB-detektion med anti-Can f 1 kunde inte ses i tungans muskelfibrer hos någon av de 14 hundarna.

DAB-detektion i bindväven kunde ses hos 12 av 14 hundar, dock sågs även DAB-detektion i minst en av kontrollerna i snitt från samtliga dessa hundar. Styrkan i denna DAB-detektion varierade. Hos 6 av 12 hundar var DAB-detektionen något starkare/intensivare för anti-Can f 1 jämfört med kontroller.

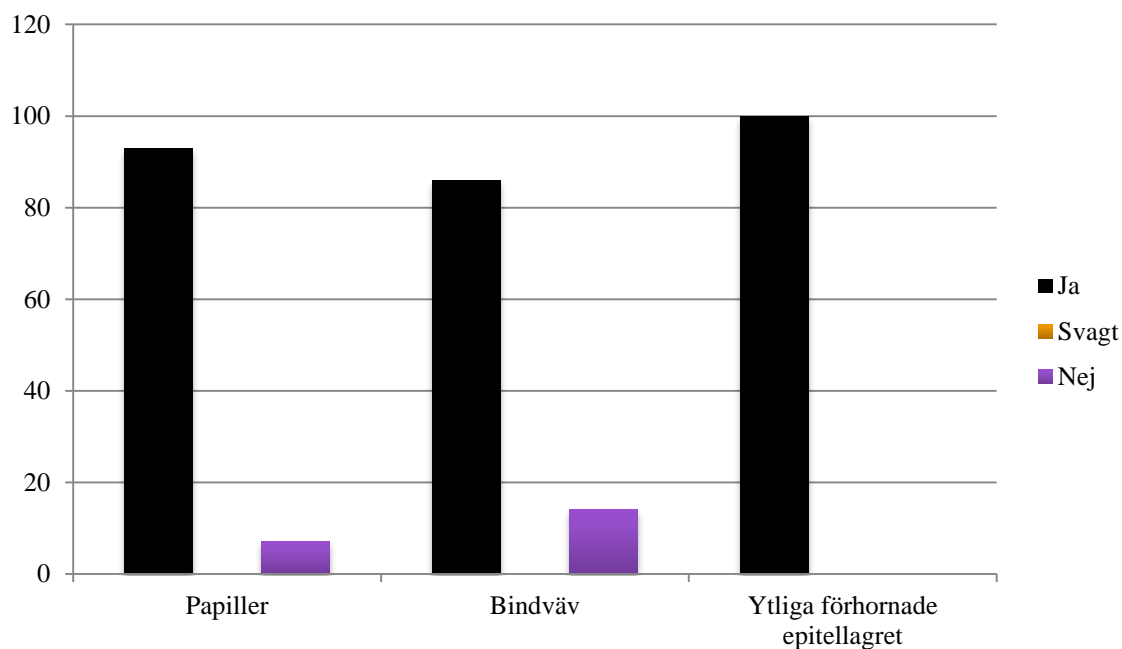
Kontroller från samtliga hundar saknade detektion i tungepitelets viabla delar. Gällande detektionen i de yttersta delarna av det förhornade epitelet kunde motsvarande detektion inte uteslutas hos kontroller från någon av de 14 hundarna. Denna detektion var dock starkare/intensivare för anti-Can f 1 jämfört med kontroller hos 11 av 14 hundar.

Tabell 3. *Can f 1 i tunga. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Papiller	13 (93 %)	1 (7 %)	0	14
Bindväv	12 (86 %)	2 (14 %)	0	14
Ytliga förhornade epitellagret	14 (100 %)	0	0	14



Figur 15. *Can f 1* i tunga från hund nr 8. Visar DAB-detektion papillepitelet.



Figur 16. *Can f 1 i tunga. Anger DAB-detektion med anti-Can f 1 i respektive del av tungan (% av 14 hundar).*

Can f 2 och Can f 3

När anti-Can f 2 användes som primärantikropp kunde ingen DAB-detektion ses som inte kunde ses i en eller båda kontrollerna. Antalet hundar med DAB-detektion på respektive lokalisation redovisas i tabell 4 samt figur 17.

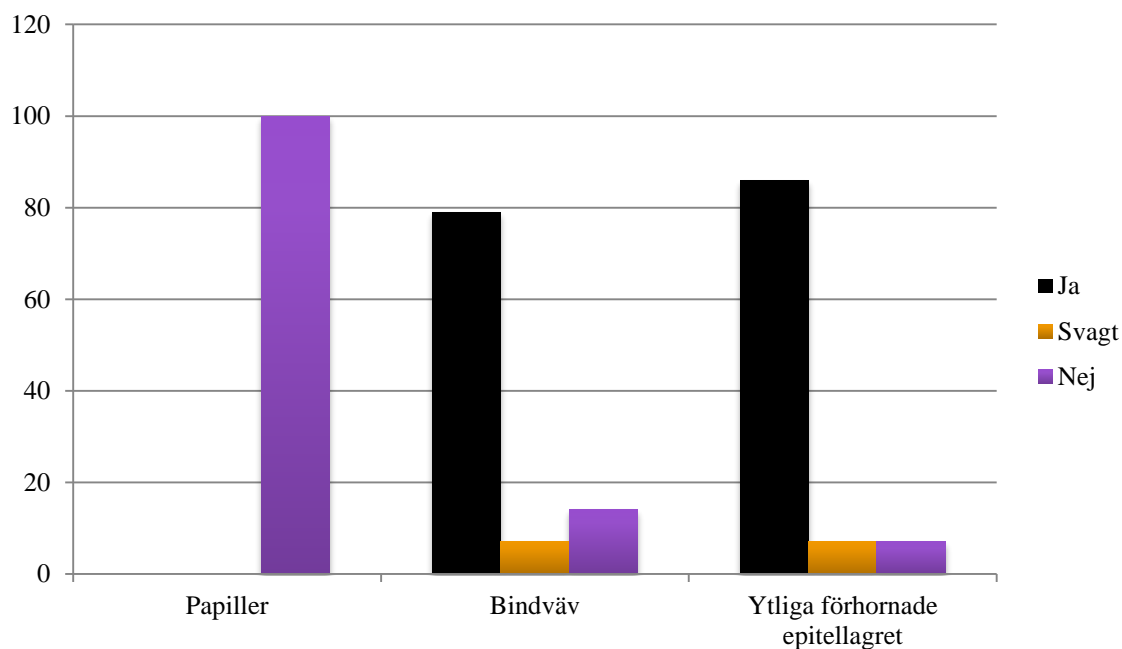
DAB-detektion med anti-Can f 2 eller Can f 3 kunde inte ses i tungans muskelfibrer hos någon av de 14 hundarna.

Styrkan/intensiteten på DAB-detektionen i bindväven (11/14) var starkare för anti-Can f 2 jämfört med kontroller endast hos 1 av 11 hundar.

Hos 1 av 12 hundar var DAB-detektionen i den yttersta delen av det förhornade epitelet starkare/intensivare för anti-Can f 2 jämfört båda kontrollerna, medan det hos 2 av 12 hundar fanns en starkare/intensivare detektion hos anti-Can f 2 jämfört med den negativa kontrollen men ej jämfört med mus IgG-kontrollen.

Tabell 4. *Can f 2 i tunga. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Papiller	0	14 (100 %)	0	14
Bindväv	11 (79 %)	2 (14 %)	1 (7 %)	14
Ytliga förhornade epitellagret	12 (86 %)	1 (7 %)	1 (7 %)	14



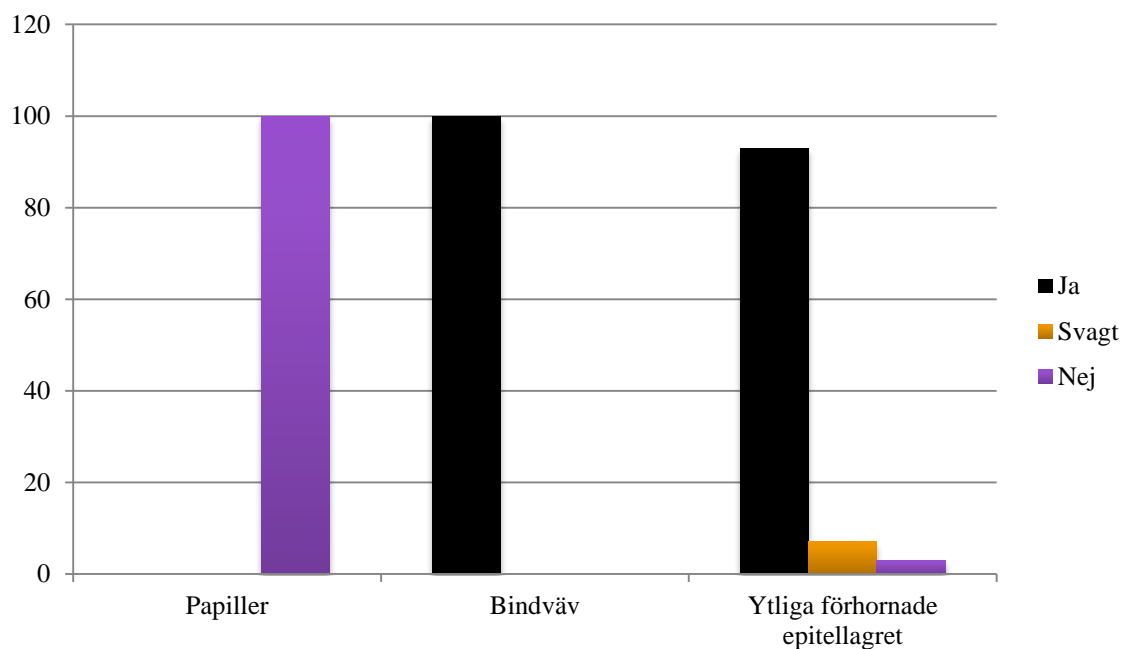
Figur 17. *Can f 2 i tunga. Anger DAB-detektion med anti-Can f 2 i respektive del av tungan (% av 14 hundar).*

Den DAB-detektion som kunde ses när anti-Can f 3 användes som primärantikropp gav ett liknande resultat som med anti-Can f 2, dock med några skillnader. I snitt från 1 av de 14 hundarna som hade detekterbar DAB-detektion i bindväven kunde inte motsvarande detektion säkert påvisas i någon av kontrollerna. Antalet hundar med DAB-detektion på respektive lokalisation redovisas i tabell 5 samt figur 18.

Hos samtliga 14 hundar var den DAB-detektion som sågs i bindväven starkare/intensivare för anti-Can f 3 jämfört med båda kontrollerna. Hos 11 (ev. 13) hundar var DAB-detektionen i den yttersta delen av det förhornade epitelet starkare för anti-Can f 3 än för kontrollerna. Hos 2 av dessa var dock DAB-detektionen endast marginellt starkare för anti-Can f 3 jämfört med kontrollerna.

Tabell 5. *Can f 3 i tunga. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Papiller	0	14 (100 %)	0	14
Bindväv	14 (100 %)	0	0	14
Ytliga förhornade epitellagret	13 (93 %)	0	1 (7 %)	14



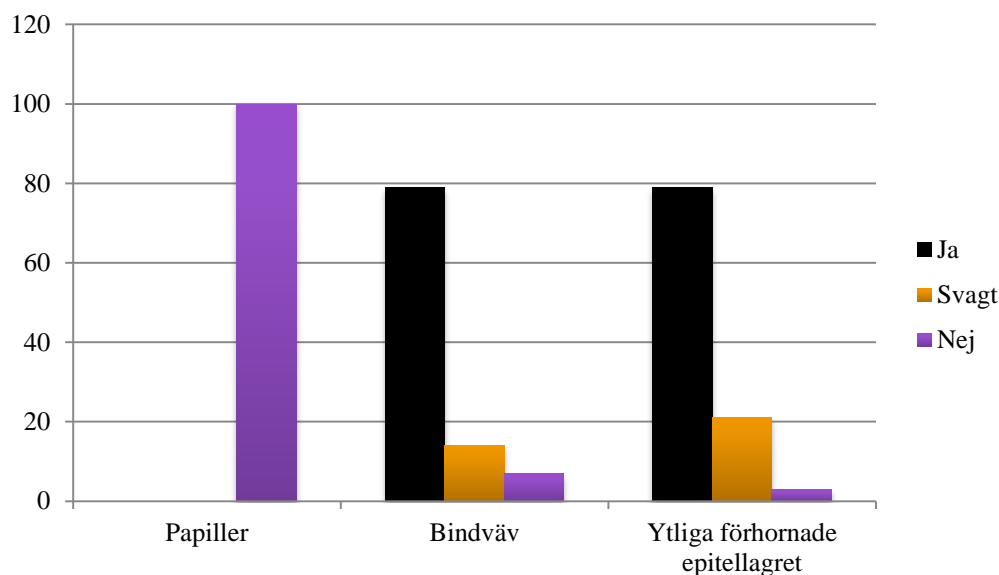
Figur 18. *Can f 3 i tunga. Anger DAB-detektion med anti-Can f 3 i respektive del av tungan (% av 14 hundar).*

Mus IgG kontroll samt negativ kontroll

I tabell 6 samt figur 19 redovisas resultatet för mus IgG kontrollen och i tabell 7 samt figur 20 redovisas resultatet för den negativa kontrollen. Överlag kan sägas att DAB-detektion, av varierande intensitet, var vanligt förekommande både i bindväven och i den yttersta delen av det förhornade epitelet. Figur 21 och figur 22 visar exempel på resultatet för mus IgG kontrollen respektive den negativa kontrollen.

Tabell 6. *Mus IgG kontroll i tunga. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

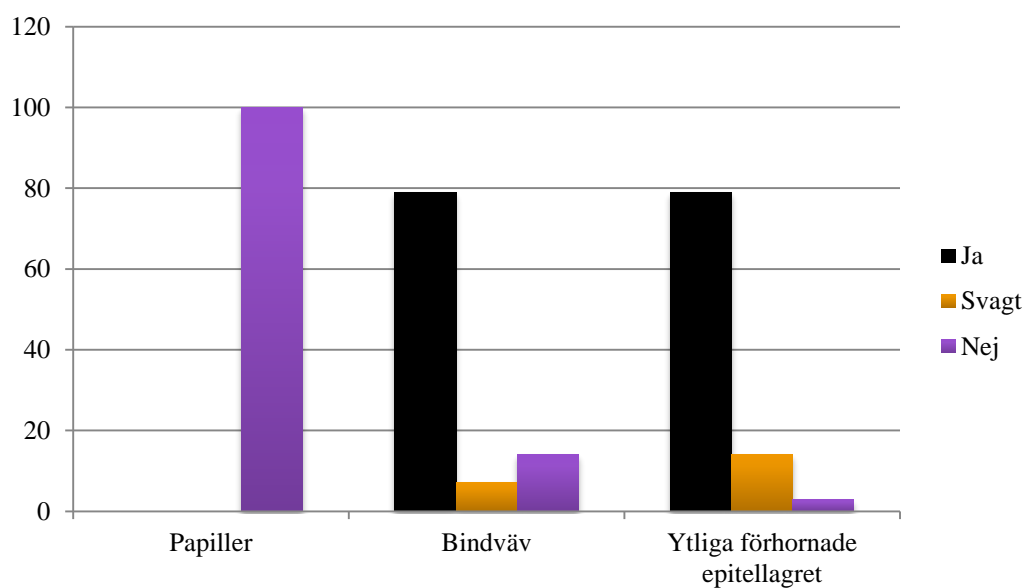
Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Papiller	0	14 (100 %)	0	14
Bindväv	11 (79 %)	1 (7 %)	2 (14 %)	14
Ytligaste förhornade epitellagret	11 (79 %)	0	3 (21 %)	14



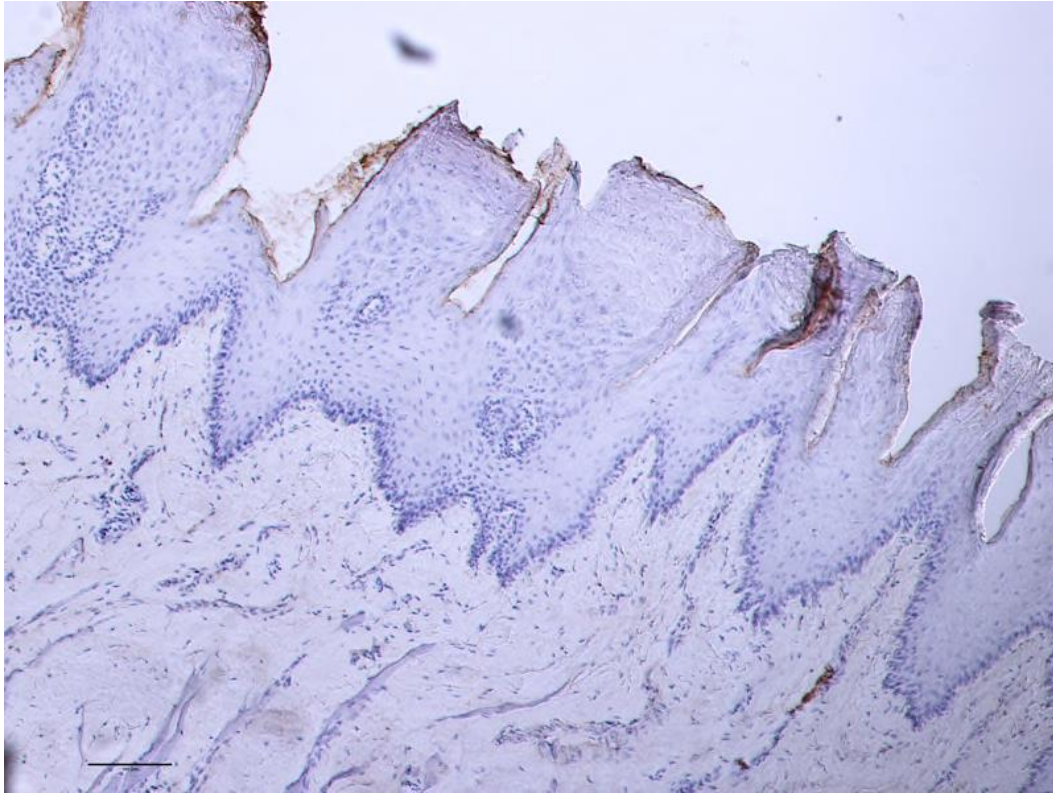
Figur 19. Mus IgG kontroll i tunga. Anger DAB-detektion med mus IgG kontroll i respektive del av tungan (% av 14 hundar).

Tabell 7. Negativ kontroll i tunga. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation

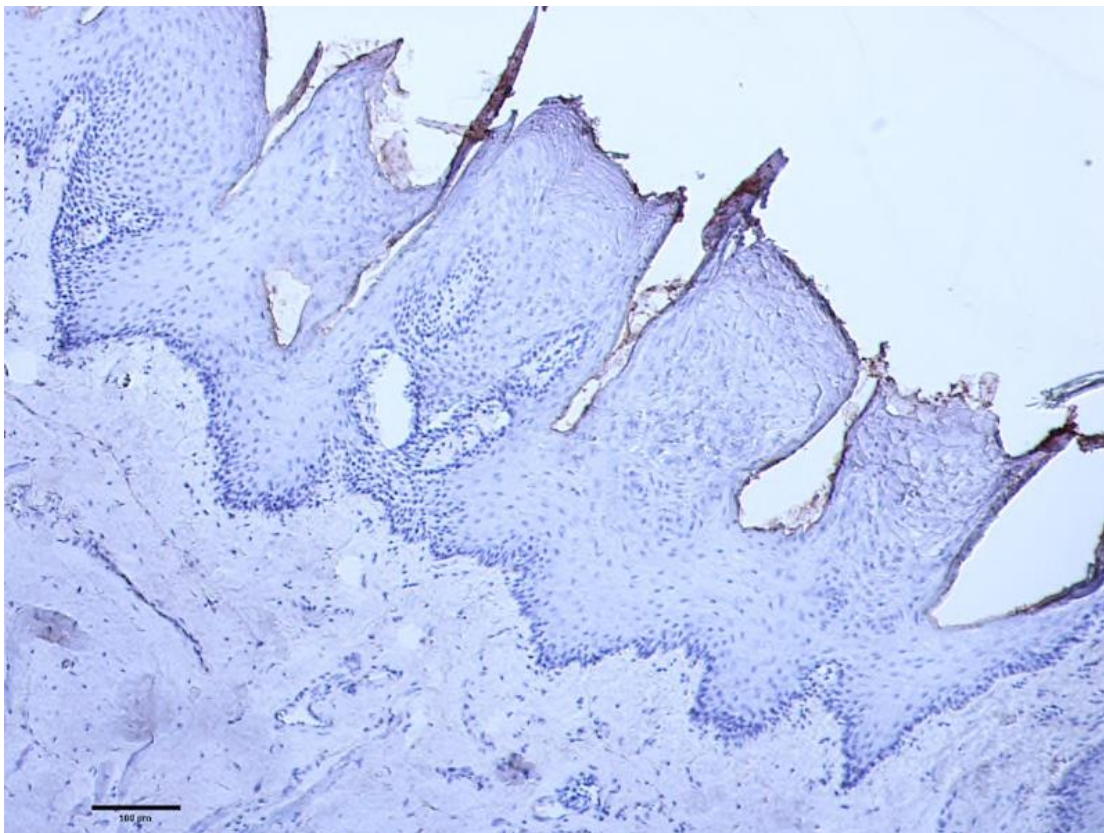
Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Papiller	0	14 (100 %)	0	14
Bindväv	11 (79 %)	2 (14 %)	1 (7 %)	14
Ytligaste förhornade epitellagret	11 (79 %)	1 (7 %)	2 (14 %)	14



Figur 20. Negativ kontroll i tunga. Anger DAB-detektion med negativ kontroll i respektive del av tungan (% av 14 hundar).



Figur 21. *Mus IgG kontroll i tunga från hund nr 8. Visar papillepitelet.*



Figur 22. *Negativ kontroll i tunga från hund nr 8. Visar papillepitelet.*

Parotisspottkörtel

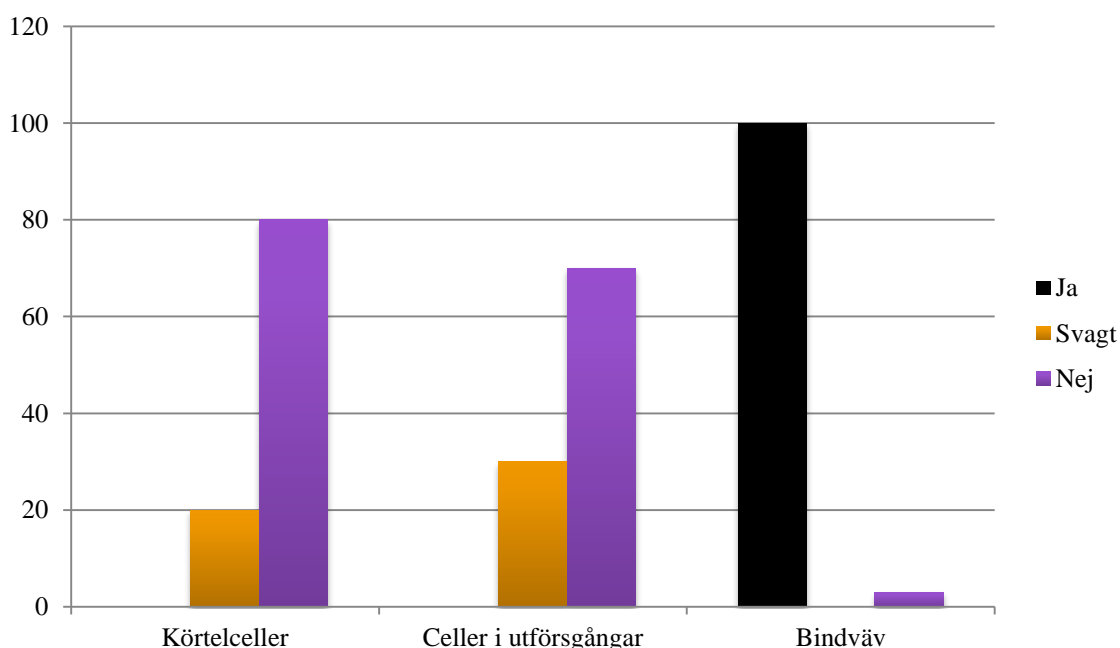
Can f 1

När anti-Can f 1 användes som primärantikropp kunde ingen säker detektion i andra strukturer än de bindvävsstråk som finns i körteln påvisas, se tabell 8 samt figur 23. En svag tendens till DAB-detektion kunde anas i körtelceller i snitt från 2 av 10 hundar (1 av 2 utan motsvarande svaga tendens till detektion i kontroller). En svag tendens till DAB-detektion kunde även ses i celler i körtelns utförsgångar i snitt från 3 av 10 hundar (ingen av dessa saknade motsvarande svaga tendens till detektion i kontroller).

I snitt fram samtliga 10 hundar som analyserats sågs DAB-detektion av varierande intensitet i bindväven. Ingen av dessa 10 hundar saknade dock motsvarande DAB-detektion i kontroller. Hos 7 (ev. 8) av de 10 hundarna sågs en starkare/intensivare DAB-detektion i bindväven med anti-Can f 1 jämfört med kontroller. Hos en hund (hund 9) sågs DAB-detektion även i körtelns tunnare bindvävsstråk.

Tabell 8. *Can f 1 i parotis. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Körtelceller	0	8 (80 %)	2 (20 %)	10
Celler i utförsgångar	0	7 (70 %)	3 (30 %)	10
Bindväv	10 (100 %)	0	0	10



Figur 23. *Can f 1 i parotis. Anger DAB-detektion med anti-Can f 1 i respektive del av parotis (% av 10 hundar).*

Can f 2

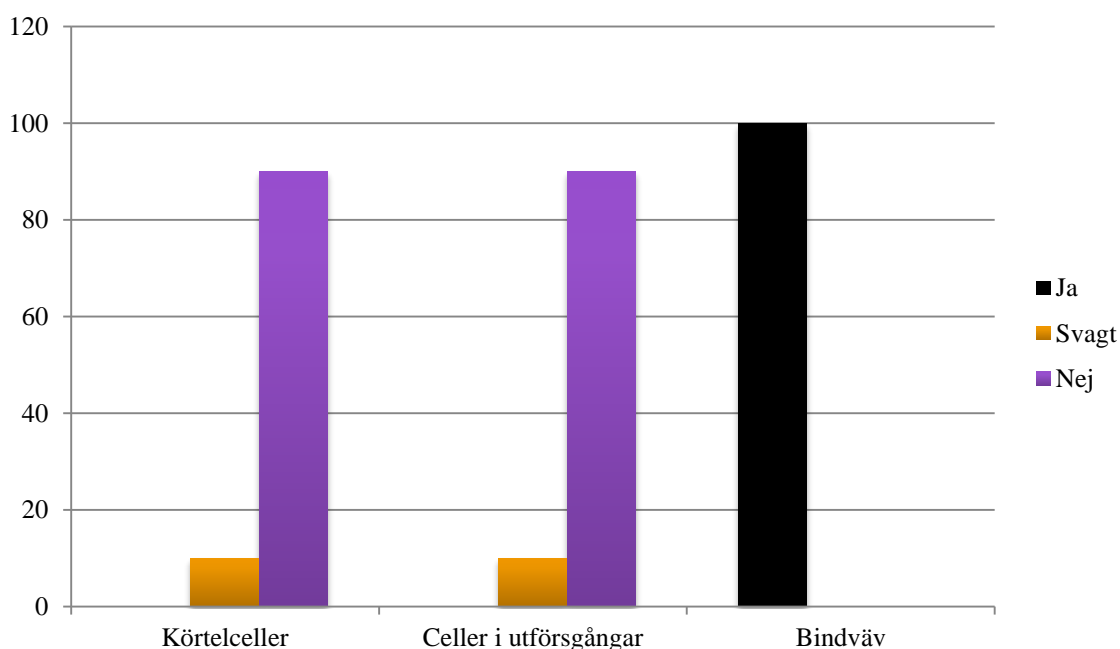
När anti-Can f 2 användes som primärantikropp kunde endast en svag tendens till DAB-detektion anas i körtelceller i ett snitt från 1 av 10 hundar, se tabell 9 samt figur 24. Denna hund uppvisade ingen motsvarande detektion i kontroller. En svag DAB-detektion kunde även anas i cellerna i körtelns

utförsgångar i snitt från 1 av 10 hundar. Denna hund uppvisade dock motsvarande svaga tendens till detektion i kontroller.

I bindväven i snitt från samtliga 10 hundar sågs en DAB-detektion av varierande intensitet. Samtliga hundar uppvisade dock motsvarande detektion i båda kontrollerna. Hos 3 (ev. 5) av 10 hundar var dock denna detektion starkare/intensivare för anti-Can f 2 jämfört med kontroller.

Tabell 9. *Can f 2 i parotis. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Körtelceller	0	9 (90 %)	1 (10 %)	10
Celler i utförsgångar	0	9 (90 %)	1 (10 %)	10
Bindväv	10 (100 %)	0	0	10



Figur 24. *Can f 2 i parotis. Anger DAB-detektion med anti-Can f 2 i respektive del av parotis (% av 10 hundar).*

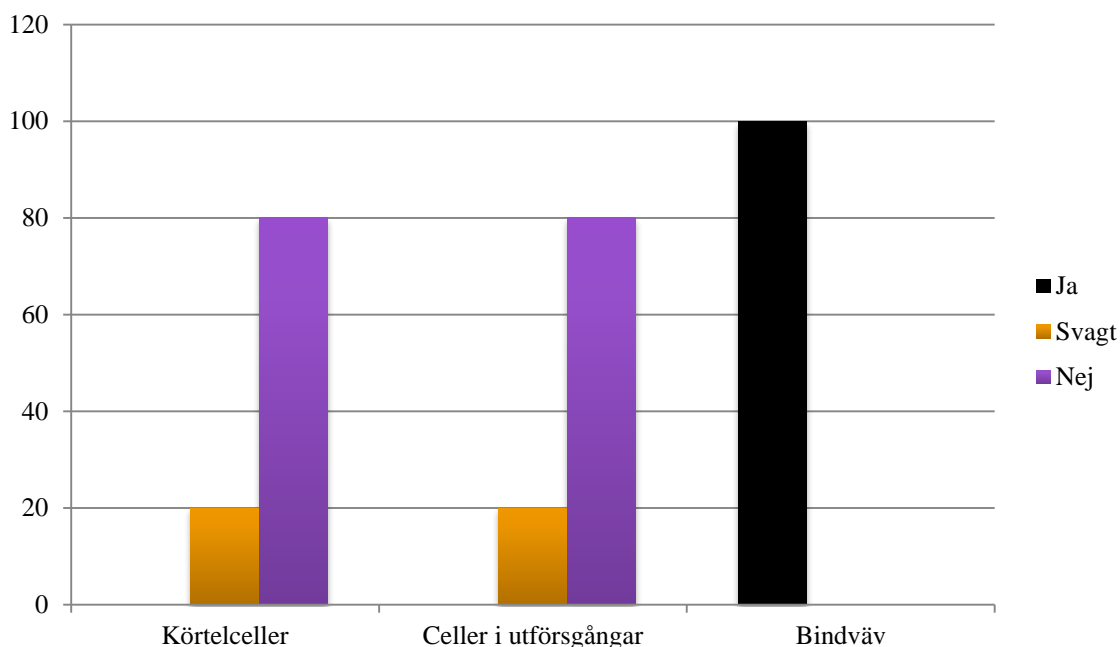
Can f 3

Anti-Can f 3 uppvisade inte någon säker detektion i andra strukturer i körteln än i bindvävsstråk, se tabell 10 samt figur 25. I snitt från 2 av 10 hundar kunde en svag tendens till DAB-detektion anas i körtelcellerna. En av dessa hundar saknade motsvarande tendens till detektion i kontroller. I snitt från 2 av 10 hundar kunde även en svag DAB-detektion anas i cellerna i körtelns utförsgångar, bägge dessa hundar uppvisade dock samma svaga DAB-detektion i kontroller.

Samtliga (10/10) hundar uppvisade en tydlig DAB-detektion i körtelns bindväv, vilken var starkare/intensivare för anti-Can f 3 jämfört med kontroller. Hos två hundar (hund 9 och 13) sågs DAB-detektion även i körtelns tunnare bindvävsstråk.

Tabell 10. *Can f 3 i parotis. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Körtelceller	0	8 (80 %)	2 (20 %)	10
Celler i utförsgångar	0	8 (80 %)	2 (20 %)	10
Bindväv	10 (100 %)	0	0	10



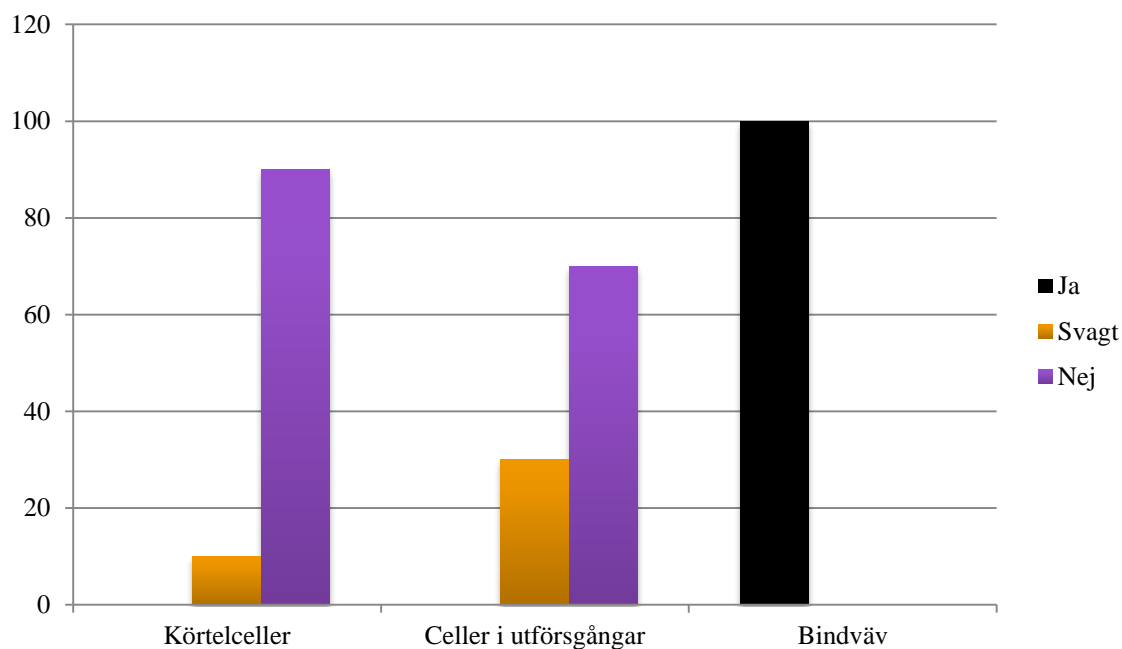
Figur 25. *Can f 3 i parotis. Anger DAB-detektion med anti-Can f 3 i respektive del av parotis (% av 10 hundar).*

Mus IgG kontroll samt negativ kontroll

I tabell 11 samt figur 26 redovisas resultat för mus IgG och i tabell 12 samt figur 27 redovisas resultat för den negativa kontrollen. DAB-detektion i bindväven förekom i bägge kontroller hos samtliga hundar. Vidare kunde även en svag DAB-detektion anas i körtelceller samt i cellerna i körteln utförsgångar, se tabell 11 respektive 12. Det var samma hundar som uppvisade denna svaga tendens till DAB-detektion i mus IgG kontrollen och den negativa kontrollen.

Tabell 11. *Mus IgG kontroll i parotis. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation*

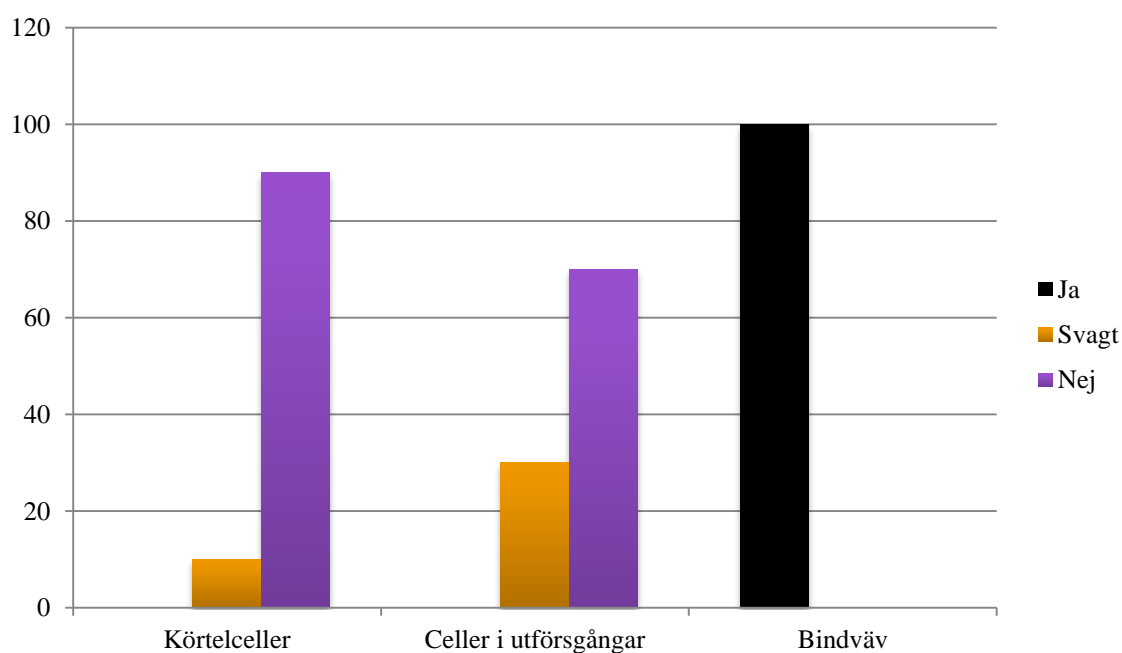
Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Körtelceller	0	9 (90 %)	1 (10 %)	10
Celler i utförsgångar	0	7 (70 %)	3 (30 %)	10
Bindväv	10 (100 %)	0	0	10



Figur 26. Mus IgG kontroll i parotis. Anger DAB-detektion med mus IgG kontroll i respektive del av parotis (% av 10 hundar).

Tabell 12. Negativ kontroll i parotis. De siffror som anges i respektive kolumn representerar antalet hundar där DAB-detektion har, eller inte har, kunnat påvisas för respektive lokalisation. Inom parentes anges procentandel av de hundar som har studerats med avseende på respektive lokalisation

Lokalisation	Ja	Nej	Tendens/svagt	Totalt
Körtelceller	0	9 (90 %)	1 (10 %)	10
Celler i utförsgångar	0	7 (70 %)	3 (30 %)	10
Bindväv	10 (100 %)	0	0	10



Figur 27. Negativ kontroll i parotis. Anger DAB-detektion med negativ kontroll i respektive del av parotis (% av 10 hundar).

Neutralisering av anti-Can f 1 i tunga

Efter preinkuberingen av anti-Can f 1 tillsammans med rekombinant Can f 1 över natt kunde ingen detektion ses i tungans viabla epitel, detta gäller båda spädningar av rekombinant Can f 1 som användes. De snitt där anti-Can f 1 inte preinkuberades med rekombinant Can f 1 uppvisade DAB-detektion i basen av papiller samt i områden mellan papiller.

Gällande DAB-detektion i tungans bindväv påvisades en synbar sådan detektion med anti-Can f 1, anti-Can f 1 som preinkuberades med rekombinant Can f 1 i den lägre spädningen samt i snitt med den blanka negativa kontrollen. Däremot kunde inte någon tydlig sådan detektion påvisas i snitt där anti-Can f 1 preinkuberades med den högre spädningen av rekombinant Can f 1, även om detektion på denna lokalisering inte kan uteslutas helt.

DAB-detektion i den yttersta delen av det förhornade epitelet kunde påvisas i med anti-Can f 1, anti-Can f 1 som preinkuberades med båda spädningar av rekombinant Can f 1 samt hos den blanka negativa kontrollen. Styrkan/intensiteten av detektion i denna lokalisering var dock lägre för anti-Can f 1 som preinkuberades med den högre spädningen av rekombinant Can f 1 samt för den negativa kontrollen än för anti-Can f 1 och anti-Can f 1 som preinkuberades med den lägre spädningen av rekombinant Can f 1.

Neutralisering av anti-Can f 3 i hud

När anti-Can f 3 som preinkuberades med naturligt Can f 3 användes som primärantikropp kunde inte DAB-detektion påvisas i någon lokalisering i huden, detta gäller båda spädningar av naturligt Can f 3 som användes. Samma resultat erhöles med den blanka negativa kontrollen. Med anti-Can f 3 som inte preinkuberades med naturligt Can f 3 kunde DAB-detektion ses i samtliga studerade lokaliseringer bortsett från i svettkörtelceller. Den hund som användes i samband med neutraliseringsförsöket hade dock heller inte uppvisat DAB-detektion i denna lokalisering tidigare.

DISKUSSION

I denna studie har vi med hjälp av immunohistokemi med antikroppar framtagna mot rekombinant Can f 1, rekombinant Can f 2 samt naturligt Can f 3 kunnat påvisa detektion av antigen framför allt med anti-Can f 1 och anti-Can f 3. Anti-Can f 1 gav upphov till detektion i tungans epitellager samt i mindre omfattning i viabla epidermis och i hårfollikelceller. Med anti-Can f 3 kunde en detektion ses i bindvävsstrukturer i hud, tunga och parotisspottkörtel, samt även i viabla epidermis, hårfollikelceller samt basalmembranzoner. Vi har inte kunnat påvisa någon tydlig specifik detektion med anti-Can f 2.

Om påvisande av antigen i de olika vävnaderna

Can f 1 och Can f 2 i parotisspottkörtel

I samband med tidigare studier av hundallergen har saliv ofta pekats ut som en trolig källa till Can f 1 och Can f 2 (Polovic *et al.*, 2013, Kamata *et al.*, 2007) och då mRNA från Can f 1 och Can f 2 har detekterats i såväl parotis- som mandibularisspottkörtel (Kamata *et al.* 2007) är det möjligt att dessa allergener produceras där. Även Can f 3 har påvisats i saliv (Polovic *et al.*, 2013). Dessutom menar Kamata *et al.* (2007) att också huden bör övervägas som möjlig produktionsplats för Can f 2.

I denna studie kunde inte ett tydligt uttryck av varken Can f 1 eller Can f 2 påvisas i parotisspottkörtel. Den svaga tendens till DAB-detektion som hos ett fåtal hundar kunde anas i körtelceller samt celler i utförsångar åtföljdes ofta av motsvarande svaga tendens till detektion i en eller båda de kontrollerna som användes. Det fanns dock enstaka undantag. Hos en hund kunde en svag tendens till DAB-detektion anas i körtelceller när anti-Can f 1 och anti-Can f 2 användes som primärantikroppar, utan att motsvarande detektion i kontroller kunde ses. Enligt Kamata *et al.* (2007) och Konieczny *et al.*

(1997) är det möjligt att det sker en posttranslationell modifiering via glykolysering av Can f 1 och Can f 2. Kamata *et al.* (2007) rapporterade att molekylvikten hos Can f 1 verkade öka från 18 kD i parotisspottkörtel till 20 kD i saliven och extrakt från päls och mjäll. Dock kunde även 18 kD-formen av proteinet påvisas i saliven. Gällande Can f 2 kunde Kamata *et al.* (2007) påvisa proteinet i en 22-23 kD form i parotisspottkörtel, saliv samt extrakt från päls och mjäll. Samtidigt menar Kamata *et al.* (2007) att den rekombinanta formen av Can f 2 endast hade en molekylvikt av 20 kD och att posttranslationell modifiering därmed skulle indikeras av förekomst av Can f 2 med högre molekylvikt. Att den rekombinanta formen av proteinet var något mindre än det naturliga proteinet skulle dock även kunna förklaras av att det rekombinanta och det naturliga proteinet ej är helt identiska. Det är möjligt att det faktum att varken Can f 1 eller Can f 2 tydligt kunde detekteras i parotisspottkörtel i denna studie till viss del beror på att de antikroppar som användes var riktade mot just en epitop på det naturliga proteinet vilken förändras vid posttranslationell modifiering och därför inte kunde kännas igen. Att Can f 1 och Can f 2 inte skulle finnas i parotisspottkörtel torde vara mindre sannolikt, eftersom båda dessa allergener tidigare har kunnat påvisas där dels genom detektion av mRNA och dels med immunoblotteknik (Kamata *et al.*, 2007).

Det är även möjligt att parotisspottkörteln inte till fullo klarat av att behålla innehållet i körtelcellerna genom alla steg i den immunohistokemiska färgningen. Blockering av endogena peroxidaser med 0,3 % H₂O₂ i metanol kan enligt Wendelboe (2013) orsaka att frysfixerade snitt släpper från glasen på grund av metanolbehandlingen. Det kan finnas en möjlighet att detta även påverkade parotisspottkörteln förmåga att hålla kvar allergenerna vilket gav upphov till frånvaron av tydlig DAB-detektion i parotis körtelceller. Om epitoperna vilka anti-Can f 1 och anti-Can f 2 antikropparna är riktade mot förändras skulle det följaktligen kunna leda till en frånvaro av detektion i vävnaden. Enligt Colley & Stead (2013) kan fixering av vävnad leda till modifiering av vissa epitoper i vävnaden. Det är även möjligt att en eventuell epitopmodifiering uppkom i samband upptining av den frysfixerade vävnaden och hantering av den i rumstemperatur i samband med kryostatsnittning samt efter rehydrering av vävnaden innan immunohistokemisk färgning. Detta kan ha tillåtit autolytiska processer att pågå i vävnaden.

Diffusion av allergenerna kan också påverka var DAB-detektion kan ses. Wendelboe (2013) menar att antigen diffunderar lättare i vävnad som inte har fixerats ordentligt. Här torde det finnas en skillnad mellan de snitt som fixerades i paraformaldehyd (hud) och de frysfixerade snitten (tunga och parotis) i vilka graden av antigen/allergendiffusion kan antas vara större. Hos 7 respektive 3 av 10 hundar kunde en starkare/intensivare DAB-detektion ses i spottkörteln bindväv med anti-Can f 1 respektive anti-Can f 2 jämfört med kontrollerna. Hos dessa hundar kan alltså DAB-detektion i bindväven bestå av både en specifik och en ospecifik komponent då allergenerna kan ha diffunderat ut från körtelcellerna till kringliggande bindväv. Att beakta vid gradering av DAB-detektionens intensitet/styrka är att det kunde skilja upp mot 15 sekunder i inkuberingstiden i DAB-lösningen mellan de olika snitten på grund av att många glas hanterades samtidigt. Detta kan eventuellt orsaka mindre skillnader i DAB-intensitet, men torde inte vara tillräckligt för att förklara större intensitetsskillnader.

Can f 3 i parotisspottkörtel, hud och tunga

När anti-Can f 3 användes som primärantikropp kunde en DAB-detektion ses i bindvävsstrukturer i samtliga tre vävnader (samtliga hundar i parotisspottkörtel och tunga samt 13/14 hundar i hud). Detektionen var även starkare/intensivare för anti-Can f 3 jämfört med kontroller hos samtliga hundar där DAB-detektion kunde ses. Albumin förekommer intra- och extravaskulärt och har kunnat påvisas i bland annat hud (Rothschild *et al.*, 1955), muskel (Rothschild *et al.*, 1955, Ellmerer *et al.*, 2000) samt subkutan (Ellmerer *et al.*, 2000). Förekomst av albumin i den interstitiella vätskan kan vara orsaken till den DAB-detektion som kunnat ses i bindväven i samtliga tre vävnader.

Då DAB-detektion i bindväven i parotis och tunga även förekom i båda kontrollerna hos majoriteten av hundarna men var starkare/intensivare för anti-Can f 3 jämfört med kontroller hos samtliga hundar är det troligt att den detektion som med anti-Can f 3 kunde ses i bindväven består av dels en ospecifik

och dels en specifik komponent. Det kan även finnas strukturer i bindväven vilka liknar epitoper hos Can f 3, det vill säga att en viss grad av korsreaktivitet även kan orsaka en del av den detektion som kunde ses. Det är också möjligt att en del av DAB-detektionen i bindväven är orsakad av en antigendiffusion av albumin i blodet ut i omkringliggande vävnad efter provinsamling och att förekomsten av albumin i de studerade vävnaderna är mindre omfattande än den immunohistokemiska bilden ger sken av. Det är troligt att det vid provinsamling uppkom blödningar i kanterna av de utskurna vävnadsbitarna vilket innebar möjlighet till blodkontamination av vävnaderna och därmed också deponering av Can f 3/albumin utanför blodkärl. Allergenet kan sedan ha diffunderat djupare in i vävnadsprovet innan dess att fullständig fixering uppnåddes. En annan möjlighet att betänka är att blodkärlsväggarna i bindväven påverkades av autolytiska processer (en viktig orsak bakom degradering av vävnaden Colley & Stead (2013)) innan dess att tillräcklig fixering uppnåddes, alternativt att fixeringen inte var tillräcklig. Detta kan ha resulterat i att kärlväggarna blivit mindre intakta varpå albumin kunnat lämna kärlen och diffunderade ut i den omgivande bindväven.

Rothschild *et al.* (1955) menar att huden har en hög koncentrationen av albumin, vilket överensstämmer med den immunohistokemiska bilden för anti-Can f 3 i denna studie. Förutom den omfattande DAB-detektionen i hudens bindväv sågs även en detektion i viabla epidermis samt i hårfollikelceller hos majoriteten av hundarna. Enligt Wendelboe (2013) är risken högre för så kallad specifik bakgrundsfärgning på grund av antigendiffusion när det aktuella antigenet förekommer extracellulärt samt när det förekommer i höga koncentrationer i blod. Båda dessa förutsättningar gäller för Can f 3 då allergenet utgörs av hundalbumin (Spitzauer *et al.*, 1993, Nilsson *et al.*, 2014a). Detta innebär att det finns en möjlighet att Can f 3 har diffunderat in i cellerna i viabla epidermis och hårfolliklar och då även passerat basalmembranen vid respektive lokalisering. Här väcks frågan om möjligheten till antigen/allergendiffusion över basalmembran och vidare ut genom epidermis respektive hårfolliklar hos den levande hunden. Can f 3 har kunnat detekteras i extrakt från päls och mjäll (Spitzauer *et al.*, 1995, Spitzauer *et al.*, 1993) samt även i pälsprover från plaster på kroppen där hundar inte kommer åt att slicka sig (nacken) (Grönlund, H., Medi-Tec, pers. medd., 2015). Sådan förekomst kan möjligen vara orsakad av diffusion av allergenet från dermal bindväv in i epidermis- och hårfollikelceller. För människor kan detta alltså utgöra grunden bakom en möjlig exponeringskälla för Can f 3.

Hos samtliga hundar kunde en tydligt mörkare zon med DAB-detektion ses på platsen för basalmembran/basalmembranzoner mellan epidermis och dermis samt runt hårfolliklar. Det är möjligt att en eventuell antigendiffusion delvis bromsades upp på dessa platser och därmed gav upphov till en starkare detektion där än i omgivande bindväv. Den detektion med anti-Can f 3 som kunde ses i konturen av talg- och svettkörtlar hos majoriteten av hundarna samt i svettkörtelceller hos ett fåtal hundar kan även den vara orsakad av antigendiffusion från omgivande bindväv. Även möjligheten till förekomst av epitoper vilka liknar epitoper hos Can f 3 bör övervägas som bidragande orsak till den mörkare DAB-detektionen i basalmembran och kring talg- och svettkörtlar. Hos ett fåtal hundar kunde en upplämnad zon ses i basalmembranzonen runt några av hårfolliklarna. Betydelsen av detta är oklar.

Can f 3 har även kunnat detekteras i saliv (Polovic *et al.*, 2013, Spitzauer *et al.*, 1993). Spridning av saliv på päls och hud i samband med att hunden slickar sig samt efterföljande diffusion ned huden utgör sannolikt inte någon större del av den DAB-detektion som kunde ses i denna studie, men kan ändå ha betydelse för hundallergiker när det kommer till allergenexponering.

I de snitt från tunga som studerades visade dock inte antigenet som anti-Can f 3 bundit till någon tendens till att passera från bindväven genom tungepitelets basalmembran och därifrån vidare till tungans yta, till skillnaden från den situation som tycks finnas i hudsnitten. Den DAB-detektion som kunde ses med anti-Can f 3 i den mest ytliga delen av det förhornade tungepitelet består troligen dels av en ospecifik komponent då motsvarande detektion kunde ses i kontroller hos de flesta av hundarna. Dels kan detektionen sannolikt vara specifik då den var starkare/intensivare för anti-Can f 3 jämfört med kontroller hos 11 av 14 hundar. Albuminförekomst kan här utgöras av blodkontamination på

tungans yta i samband med provinsamlingen, alternativt på grund av förekomst i saliven där allergenet påvisats av Polovic *et al.* (2013) samt Spitzauer *et al.* (1993).

Can f 1 och Can f 2 i hud och tunga

Hos ett fåtal hundar kunde en svag DAB-detektion ses i viabla epidermis samt i hårfollikelceller när anti-Can f 1 användes som primärantikropp. Detektion kunde inte ses i bindväv i dermis eller i basalmembranzoner, varken mellan epidermis och dermis eller kring hårfolliklar. Allergendiffusion från dermal bindväv och in i epidermala celler respektive hårfollikelceller är därför mindre troligt som orsak till detektionen i dessa lokalisationer. Kamata *et al.* (2007) kunde påvisa mRNA för Can f 1 i hud, dock i mindre mängd. Finns mRNA i en cell innebär det troligen att genen som kodade för detta mRNA uttrycks. En hypotes är därför att Can f 1 produceras i viabla epidermis och hårfollikelceller, om än i mindre mängd och kanske inte hos alla hundar. Det är också möjligt att allergenförekomst i saliven orsakar deposition av allergen på huden när hunden skickar sig (Kamata *et al.*, 2007). Hypotesen är då att allergen diffunderar från hudytan, genom stratum corneum in i keratinocyter, samt ned i hårfolliklar och in i hårfollikelceller. Dock har Can f 1 kunnat detekteras i pälsprover från platser på kroppen där hundar inte kommer åt att slicka sig (nacken) (Grönlund, H., Medi-Tec, pers. medd., 2015). Detta kan stödja hypotesen att det sker en produktion av Can f 1 i viabla epidermis och/eller hårfolliklar, varifrån det sker en efterföljande spridning till hundens päls.

Hos ett fåtal hundar kunde en DAB-detektion av varierande grad ses i stratum corneum i hudsnittet med anti-Can f 1 (även med anti-Can f 3). Värt att notera är att stratum corneum bevarades till olika grad hos de olika hundarna och därmed varierade i tjocklek. Detta påverkar sannolikt graden av DAB-detektion i detta cellager. Förekomst av allergen/antigen i denna lokalisering kan vara orsakad av salivkontamination eller förekomst i viabla epidermis.

Ett tydligt mönster av DAB-detektion lokaliserad till tungans epitel sågs med anti-Can f 1. De mest basala cellerna i epitelet visade dock ingen detektion, varför diffusion från underliggande bindväv är mindre trolig. Dessutom var graden av detektion starkare i epitelet än i bindväven vilket stödjer resonemanget. Gällande möjlighet till produktion av Can f 1 i tungan, kunde Konieczny *et al.* (1997) påvisa mRNA för allergenet i tungvävnad medan Kamata *et al.* (2007) inte lyckades med detta. En möjlig orsak till de olika resultaten kan vara skillnader i metodval mellan studierna. Varken Konieczny *et al.* (1997) eller Kamata *et al.* (2007) redogör närmare för vilken del av tungan som användes för analys eller antalet hundar inkluderade i respektive studie. Även detta är faktorer som kan ligga bakom skillnaden i resultat mellan de båda studierna. Can f 1 har dock kunnat detekteras i saliv av exempelvis Polovic *et al.* (2013) och Kamata *et al.* (2007). Konieczny *et al.* (1997) menar att Can f 1 kan vara hundens homolog till von Ebners körtelprotein hos människa. von Ebners körtlar ska dock endast vara belägna kring circumvallate/vallgravs papiller vilka inte förekommer överallt på tungans yta utan på den bakre, dorsala delen (Mescher, 2010). Konieczny *et al.* (1997) menar att de kunnat detektera mRNA för Can f 1 i von Ebners körtelvävnad. Man anger dock inte hur man säkerställt att denna körteltyp förekom i den tungvävnad som användes, varför den slutsats som drogs av Konieczny *et al.* (1997) bör ifrågasättas i detta hänseende. I vår studie är det inte sannolikt att samtliga papiller som inkluderades i tungsnitten hos majoriteten av hundarna var just vallgravspapiller. Att anti-Can f 1 gav upphov till DAB-detektion mellan och i basen av papiller i tungsnitten kan tyda på att det antigen som anti-Can f 1 binder till produceras i tungepitelet, alternativt att antigenet finns i saliven och diffunderar ned i epitelet från ytan efter att ha ansamlats mellan papillerna. Om Can f 1 är hundens homolog till von Ebners körtelprotein kan produktion av allergenet i von Ebners körtlar med efterföljande spridning i saliven vara en möjlig orsak till den detektion som kunde ses. Förekomst av allergenet i saliven på grund av produktion i någon/några av de större spottkörtlarna är även det ett möjligt alternativ. DAB-detektion i den mest ytliga delen av tungans förhornade epitel kunde påvisas hos majoriteten av hundarna för samtliga studerade antikroppar samt för de båda kontrollerna. Hos de flesta av hundarna var en sådan detektion kraftigare/mer omfattande hos anti-Can f 1 jämfört med kontroller. Detta gällde dock inte för anti-Can f 2. Förekomst av DAB-detektion med denna lokalisering i båda kontrollerna visar att det finns en ospecifik komponent i

detektionen. Det verkar dock även finnas en specifik komponent orsakad av anti-Can f 1. Möjliga orsaker till denna detektion torde vara de samma som för detektionen längre ned i tungans epitel.

I det fall både Can f 1 och Can f 2 finns i betydande mängd i saliven och om det är förekomst av Can f 1 i saliven med diffusion in i epitelet som orsakat detektionen med anti-Can f 1, ter det sig märkligt att endast anti-Can f 1 gav en synlig DAB-detektion i tungans epitel och inte anti-Can f 2. Can f 1 och Can f 2 ligger inte långt från varandra storleksmässigt (18-20 kD respektive 22-23 kD (Kamata *et al.*, 2007)) och lipokaliner liknar varandra med avseende på kristallstruktur (Flower, 1996). Möjligen kan ytstrukturer orsaka skillnader i diffusion in i cellerna, då graden av homologi mellan aminosyrasekvenserna hos Can f 1 och Can f 2 har uppskattats till endast 24,5 % (Kamata *et al.*, 2007). Skillnaden i grad av DAB-detektion mellan de båda antigenen kan också stödja att Can f 1 produceras i tungans epitelceller men inte Can f 2. För Can f 2 har mRNA dock kunnat påvisas i tungvävnad (Konieczny *et al.*, 1997, Kamata *et al.*, 2007) vilken kan tyda på att allergenet produceras där. Möjligheten att de anti-Can f 2 antikroppar som användes i samband med denna immunohistokemi var defekta eller att de var riktade mot ett annat antigen än Can f 2 bör beaktas. Faktorer som kan ha påverkat funktionen hos antikropparna efter framställande är bland annat förvarings- och transportförhållanden, exempelvis bristande kylkedja, upprepade upptining och nedfrysning samt ljusexponering.

Gällande skillnaden i intensitet hos DAB-detektionen i tungans bindväv mellan anti-Can f 1 och kontroller, var detektionen endast starkare hos anti-Can f 1 i 50 % av fallen och skillnaden mellan anti-Can f 1 och kontroller var sällan av det större slaget. Detta medför att betydelsen av detektionen är svår att uttala sig om. Här kan faktorer som skillnad i inkuberingstid i DAB-lösningen ha påverkat den skillnad som kunde ses. Möjligheten till allergendiffusion från epitel finns också, om än detta bedöms som mindre troligt. Individuella skillnader i allergenförekomst mellan de olika hundarna utgör även det en aspekt att beakta.

Felkällor

Vid användning av antikroppar för detektion av olika antigen finns alltid en risk att antikropparna binder in till något annat än det tänka antigenet. Antigen enbart ett önskat antigen eller en kombination av det önskade antigenet och oönskade antigen orsakat av korsreaktivitet. Att DAB-detektion på ett flertal intressanta lokaliseringar kunde ses i denna studie innebär alltså inte nödvändigtvis att det är de tänka allergenerna, framför allt Can f 1 och Can f 3, som har kunnat påvisas. Det faktum att lyckade neutraliseringsförsök med rekombinant Can f 1 (tunga) respektive naturligt Can f 3 (hud) har genomförts ökar dock sannolikheten att påvisad DAB-detektion representeras av de studerade allergenerna, förutsatt att de antigen/allergen som användes i neutraliseringsförsöken verkligen motsvarade de naturligt förekommande allergenerna.

En orsak till eventuell ospecifik DAB-detektion utgörs av inadekvat blockering av endogena peroxidaser i samband med den immunohistokemiska färgningen. Detta eftersom endogena enzymer kan ge upphov till falskt positiv detektion när specificiteten hos dessa enzymer liknar den hos enzymer som används i den immunohistokemiska färgningen (Pace, 2013). Enligt Wendelboe (2013) är endogen peroxidasaktivitet vanligt förekommande i hemproteiner så som myoglobin och hemoglobin. Det faktum att de muskelfibrer som finns i tungan ej uppvisade DAB-detektion i denna studie ökar sannolikheten att blockeringen av endogena peroxidaser var till stora delar lyckad, även om det inte utesluter fläckvis bristande blockering. Ytterligare en orsak till ospecifik färgning kan vara att vävnaden hunnit torka ut i samband hanteringsprocessen innan eller under den immunohistokemiska färgningen. Detta då det enligt Colley & Stead (2013) kan uppkomma ospecifik absorption av reagenter i vävnad som torkat.

Andra felkällor i samband med det laboratoriska arbetet är långsam nedfrysning eller blodkontamination av vävnadsprover samt eventuell skillnad i tjocklek hos snitten. Även faktorer som inadekvat blandning av antikroppar och övriga reagenser samt skillnader i inkuberingstider kan utgöra möjliga felkällor. Gällande inkuberingstider, med undantag av DAB-inkuberingen, förekom det inte

betydande skillnader inom hundar utan endast mellan olika hundar. Grad av DAB-detektion hos olika antikroppar bedömdes i förhållande till kontroller från samma hund, vilket minskar betydelsen av denna felkälla. Det faktum att grad av DAB-detektion bedömdes manuellt innebär även det en viktig felkälla att beakta. För att minska på åtgången av de olika reagenserna användes mindre volymer av dem än vad som stod angivet i instruktionerna, dock med motsvarande förhållande mellan reagenserna. Detta innebär att locket på reagensflaskorna plockades av upprepade gånger, varför möjlighet till kontamination av reagenserna föreligger. De blandningsflaskor som följde med Vectastain Elite Mouse IgG ABC Kit från Vector laboratories användes inte. Istället användes plaströr med skruvkork (mjölkör), nya rör vid varje körning. Detta på grund av ett missförstånd som ledde till att blandade lösningar blev stående i kittets blandningsflaskor ca 3 månader efter det att pilotkörningen genomfördes. Då DAB-detektion ändå kunde ses hade detta förhoppningsvis inte någon större betydelse, exempelvis i form av att reagenser fastnade på ytan av rören. Volymen av reagenser och antikroppar som applicerades på snitten skiljde sig inte åt inom de olika hundarna. Däremot påverkade faktorer som snittens storlek och antal glas i en körning den volym av lösningarna som behövdes respektive kunde användas. Skillnader i detta hänseende fanns alltså mellan olika hundar och inte inom en och samma hund och när skillnad förekom rörde det sig om cirka 50 µl differens. I anvisningarna som medföljde ABC kittet saknades angivelser gällande vilken volym av de olika lösningarna som skulle appliceras på respektive snitt, varför denna skillnad förhoppningsvis är av mindre betydelse.

Konklusion

Sammanfattningsvis har förekomst av antigen som plockats upp av anti-Can f 1-antikroppar kunnat påvisas i framför allt tungans epitel men även till viss del i viabla epidermis samt hårfollikelceller. Med anti-Can f 3-antikroppar har ett antigen kunnat detekteras i viabla epidermis, basalmembranzoner och hårfollikelceller samt även i bindvävsstrukturer (i hud, tunga och parotisspottkörtel). De anti-Can f 2 antikroppar som användes gav inte upphov till någon tydlig antigenetektion i någon av de studerade vävnaderna.

Genomgående kunde en skillnad i grad av antigen/allergendetektion ses mellan de olika hundarna, framförallt gällande anti-Can f 3 i hud. Även i grad av antigen/allergendetektion med anti-Can f 1 i tungans epitellager kunde en skillnad ses mellan olika hundar. Detta kan orsakas av att det finns en individuell skillnad i uttryck av allergener, även om resultatet i huvudsak bör relateras och jämföras med andra antikroppar och kontroller inom en och samma hund. En variation i grad av allergenuttryck kan sannolikt kopplas till att vissa hundallergiska individer reagerar på en del hundar men inte på andra.

Frånvaro av tydlig detektion i de sekretoriska delarna av parotisspottkörteln motsäger inte förekomst av allergenen i körteln, framförallt gällande Can f 1 och Can f 2. Istället visar det på behovet av vidare bearbetning av den här typen av detektionsmetod för att möjliggöra framtida allergendetektion med immunohistokemi i denna vävnad. En möjlighet kan vara att formalinfixera parotisspottkörteln för att på så vis minska risken för antigenförlust i samband med färgningsprocessen. Denna studie har förhoppningsvis kunnat bidra till att öka kunskapen kring förekomsten av Can f 1 och Can f 3. Hundallergi kan komplicera och begränsa vardagen för drabbade individer, varför fortsatt forskning inom ämnet är nödvändigt för att förbättra diagnostik- och behandlingsmetoder. I sådan forskning bör även studier kring allergenförekomst ingå. Till vår kännedom har inte studier liknande denna hittills genomförts, vilket dels bidrar till ökat intresse för resultaten och dels medför att arbetet kan utgöra en grund för fortsatta immunohistokemiska studier inom ämnet.

REFERENSER

Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. (2010). *Cellular and molecular immunology*. 6. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier.

- Aukland, K. & Fadnes, H. O. (1973). Protein concentration of interstitial fluid collected from rat skin by a Wick method. *Acta Physiologica Scandinavica*, 88: 350-358.
- Basagaña, M., Bartolome, B., Pastor-Vargas, C., Matsson, L., Lidholm, J. & Labrador-Horrillo, M. (2012). Involvement of Can f 5 in a case of human seminal plasma allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 159: 143-146.
- Berson S. A., Yalow, R. S., Schreiber, S. S. & Post, J. (1953). Tracer experiments with I¹³¹ labeled human serum albumin: distribution and degradation studies. *The Journal of Clinical Investigation*, 32(8): 746-768.
- Bläker, M., Kock, K., Ahlers, C., Buck, F. & Schmale, H. (1993). Molecular cloning of human von Ebner's gland protein, a member of lipocalin superfamily highly expressed in lingual salivary glands. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1172: 131-137.
- Böcskei, Z., Groom, C. R., Flower, D. R., Wright, C. E., Phillips, S. E. V., Cavaggioni, A., Findlay, J. B. C. & North, A. C. T. (1992). Pheromone binding to two rodent urinary proteins revealed by X-ray crystallography. *Nature (Letters to Nature)*, 360: 186-188.
- Chapdelaine, P., Potvin, C., Ho-Kim, M. A., Larouche, L., Bellemare, G., Tremblay, R. T. & Dubé, J. Y. (1988). Androgen regulation of canine prostatic arginine esterase mRNA using cloned cDNA. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 56: 63-70.
- Colley, E. C. & Stead, R. H. (2013). Fixation and other pre-analytiska factors. I: Taylor, C. R. & Rudbeck, L. (red), *Immunohistochemical Staining Methods*. 6. ed. Dako Denmark A/S, 20-29.
- Curin, M., Reininger, R., Swoboda, I., Focke, M., Valenta, R. & Spitzauer, S. (2011). Skin prick test extracts for dog allergy diagnosis show considerable variations regarding the content of major and minor dog allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 154: 258-263.
- De Groot, H., Goei, K. G. H., van Swieten, P. & Aalberse, R. C. (1991). Affinity purification of a major and minor allergen from dog extract: Serologic activity of affinity-purified Can f 1 and of Can f 1-depleted extract. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 87: 1056-1065.
- Dyce, K. M., Sack, W. O. & Wensing, C. J. G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4. ed. St. Louis. Saunders Elsevier.
- Ellmerer, M., Schaupp, L., Brunner, G. A., Sendlhofer, G., Wutte, A., Wach P. & Pieber T. R. (2000). Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 278: E352-E356.
- El Sharaby, A. A., El-Gendy, S. A., Alsafy, M. A., Nomir, A. G. & Wakisaka, S. (2014). Morphological variations of the vallate papilla in some mammalian species. *Anatomical Science International*, 89: 161-170.
- Fajt, M. L. & Wenzel, S. E. (2013). Mast cells, their subtypes, and relation to asthma phenotypes. *Annals of the American Thoracic Society*, 10: S158-S164.
- Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*, 318: 1-14.
- Frappier, B. (2006). Digestive system. I: Eurell, J. & Frappier, B. (red), *Dellmann's textbook of veterinary histology*. 6. ed. Aimes: Blackwell Publishing, 170-211.
- Irani, A. A., Schechter, N. M., Craig, S. S., DeBlois, G. & Schwartz, L. B. (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 4464-4468.

- Iwasaki, S. & Miyata, K. (1989). Fine structure of the filiform papilla of beagle dogs. *Journal of Morphology*, 201: 235-242.
- Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. (2005). *Immunobiology: The immune system i health and disease*. 6. ed. New York & Oxon: Garland Science Publishing.
- Jenkinson, D. M. (1990). Sweat and sebaceous glands and their function in domestic animals. I: von Tschärner, C. & Halliwell, R. E. W. (red), *Advances in Veterinary Dermatology*. 1. ed. Philadelphia: Baillière Tindall, 229-251.
- Kamata, Y., Miyanomae, A., Nakayama, E., Miyanomae, T., Tajima, T. & Hoshi, H. (2007). Characterization of dog allergens Can f 1 and Can f 2. 1. Preparation of their recombinant forms and antibodies. *International Archives of Allergy and Immunology*, 142: 291-300.
- Konieczny, A., Morgenstern, J. P., Bizinkauskas, C. B., Lilley, C. H., Brauer, A. W., Bond, J. F., Aalberse, R. C., Wallner, B. P. & Kasaian, M. T. (1997). The major dog allergens *Can f* 1 and *Can f* 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. *Immunology*, 92: 577-586.
- Liem, R. S., van Willigen, J. D., Copray, J. C. & Ter Horst, G. J. (1990). Corpuscular bodies in the palate of the rat. 1. Morphology and distribution. *Acta Anatomica*, 138: 56-64.
- Lloyd, D. H. & Garthwaite, G. (1982). Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Research in Veterinary Science*, 33: 99-104.
- Madhurantakam, C., Nilsson, O. B., Uchtenhagen, H., Konradsen, J., Saarne, T., Högbom, E., Sandalova, T., Grönlund, H. & Achour, A. (2010). Crystal structure of the dog lipocalin allergen Can f 2: Implications for cross-reactivity to the cat allergen Fel d 4. *Journal of Molecular Biology*, 401: 68-83.
- Matsson, L., Lundgren, T., Everberg, H., Larsson, H. & Lidholm, J. (2009). Prostatic kallikrein: A new major dog allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123: 362-368.
- Matsson, L., Lundgren, T., Olsson, P., Sundberg, M. & Lidholm, J. (2010). Molecular and immunological characterization of Can f 4: a dog dander allergen cross-reactive with 23 kDa odorant-binding protein in cow dander. *Clinical and Experimental Allergy*, 40: 1276-1287.
- Medi-Tec research and development Stockholm AB (2015-04-29a). *Medi-Tec research and development*. <http://www.medi-tec.com/palsdjursallergi/allergisk-mot-hund> [2015-08-28]
- Medi-Tec research and development Stockholm AB (2015-04-29b). *Medi-Tec research and development*. <http://medi-tec.se/forskning-utveckling/alternativ-till-immunterapi> [2015-08-31]
- Mescher, A. L. (2010). *Junqueira's Basic Histology: text and atlas*. 12. ed. New York: McGraw-Hill Medical.
- Mescher, A. L. (2013). *Junqueira's Basic Histology: text and atlas*. 13. ed. New York: McGraw-Hill Medical.
- Metcalf, D. D., Baram, D. & Mekori, Y. A. (1997). Mast cells. *Physiological Reviews*, 77 no 4: 1033-1079.
- Miller, W. H., Griffin, C. E. & Campbell, K. L. (2013). *Muller and Kirk's small animal dermatology*. 7. ed. St. Louis: Elsevier Mosby.
- Morris, D. (2010). Human allergy to environmental pet danders: a public health perspective. *Veterinary Dermatology*, 21: 441-449.

- Nilsson, O. B., Binnmyr, J., Zoltowska, A., Saarne, T., van Hage, M. & Grönlund, H. (2012). Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: the role in cross-reactivity with cat and horse. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 67: 751-757.
- Nilsson, O. B., Neimert-Andersson, T., Bronge, M., Grundström, J., Sarma, R., Uchtenhagen, H., Kikhney, A., Sandalova, T., Holmgren, E., Svergun, D., Achour, A., van Hage, M. & Grönlund, H. (2014b). Designing a multimer allergen for diagnosis and immunotherapy of dog allergic patients. *PLoS ONE*, 9(10): e111041.
- Nilsson, O., van Hage, M. & Grönlund, H. (2014a). Mammalian-derived respiratory allergens – Implications for diagnosis and therapy of individuals allergic to furry animals. *Methods*, 66: 86-95.
- Ojima, K. (2001). Functional and angioarchitectural structure and classification of lingual papillae on the postero-dorsal surface of the beagle dog tongue. *Annals of Anatomy*, 183: 19-24.
- Pace, G. E. (2013). Optimization of immunohistochemical reactions. I: Taylor, C. & Rudbeck, L. (red), *Immunohistochemical Staining Methods*. 6. ed. Dako Denmark A/S, 102-109.
- Pandjaitan, B., Swoboda, I., Brandejsky-Pichler, F., Rumpold, H., Valenta, R. & Spitzauer, S. (2000). *Escherichia coli* expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105: 279-285.
- Polovic, N., Wadén, K., Binnmyr, J., Hamsten, C., Grönneberg, R., Palmberg, C., Milcic-Matic, N., Bergman, T., Grönlund, H. & van Hage, M. (2013). Dog saliva – an important source of dog allergens. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 68: 585-592.
- Rouvinen, J., Rautiainen, J., Virtanen, T., Zeiler, T., Kauppinen, J., Taivainen, A. & Mäntyjärvi, R. (1999). Probing the molecular basis of allergy. Three-dimensional structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 2337-2343.
- Ross, M. H. & Pawlina, W. (2011). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. 6. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Rothschild, M. A., Bauman, A., Yalow, R. S. & Berson, S. A. (1955). Tissue distribution of I¹³¹ labeled human serum albumin following intravenous administration. *The Journal of Clinical Investigation*, 34(9): 1354-1358.
- Rytkönen-Nissinen, M., Saarelainen, S., Randell, J., Häyrinen, J., Kalkkinen, N. & Virtanen, T. (2015). IgE reactivity of the dog lipocalin allergen Can f 4 and the development of a sandwich ELISA for its quantification. *Allergy, Asthma and Immunology Research*, 7: 384-392.
- Saarelainen, S., Taivainen, A., Rytkönen-Nissinen, M., Auriola, S., Immonen, A., Mäntyjärvi, R., Rautiainen, J., Kinnunen, T. & Virtanen, T. (2004). Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f 2 for the diagnosis of dog allergy. *Clinical and Experimental Allergy*, 34: 1576-1582.
- Samuelson, D. A. (2007). *Textbook of veterinary histology*. St. Louis: Saunders Elsevier.
- Schou, C., Svendsen, U. G. & Løwenstein, H. (1991). Purification and characterization of the major dog allergen, Can f 1. *Clinical and Experimental allergy*, 21: 321-328.
- Sjaastad, Ø. V., Sand, O. & Hove, H. (2010). *Physiology of domestic animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Spitzauer, S., Pandjaitan, B., Söregi, G., Mühl, S., Ebner, C., Kraft, D., Valenta, R. & Rumpold, H. (1995). IgE cross-reactivities against albumins in patients allergic to animals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 96: 951-959.

- Spitzauer, S., Schweiger, C., Anrather, J., Ebner, C., Scheiner, O., Kraft, D. & Rumpold, H. (1993). Characterisation of dog allergens by means of immunoblotting. *International Archives of Allergy and Immunology*, 100: 60-67.
- Spitzauer, S., Schweiger, C., Sperr, W. R., Pandjaitan, B., Valent, P., Mühl, S., Ebner, C., Scheiner, O., Kraft, D., Rumpold, H. & Valenta, R. (1994). Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 93: 614-627.
- Stewart, G. A. & Thompson, P. J. (1996). The biochemistry of common aeroallergens. *Clinical and Experimental allergy*, 26: 102-1044.
- Tartaglia, L. & Waugh, A. (2005). *Veterinary physiology and applied anatomy*. Rev. Edinburg, Elsevier.
- Tizard, I.R. (2009). *Veterinary Immunology*. 8. ed. St. Louis: Saunders Elsevier.
- Travers, S. P. & Nicklas, K. (1990). Taste bud distribution in the rat pharynx and larynx. *The Anatomical Record*, 227: 373-379.
- Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B., Kraft, D. & Grönlund, H. (1999). The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy. *Clinical and Experimental Allergy*, 29: 896-904.
- van Ree, R., van Leeuwen, A., Bulder, I., Bond, J. & Aalberse, R. (1999). Purified natural and recombinant Fel d 1 and cat albumin in in vitro diagnostics for cat allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104: 1223-1230.
- Wendelboe, H. G. (2013). Background. I: Taylor, C. & Rudbeck, L. (red), *Immunohistochemical Staining Methods*. 6. ed. Dako Denmark A/S, 170-179.
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (2012-04-03). *Allergen Nomenclature*. <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=709> [2015-11-28]
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (2014-01-09a). *Allergen Nomenclature*. <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=174> [2015-09-17]
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (2014-01-09b). *Allergen Nomenclature*. <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=174> [2015-11-28]
- WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (2014-01-10c). *Allergen Nomenclature*. <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=176> [2015-11-29]
- Yamamoto, Y., Atoji, Y. & Suzuki, Y. (1997). Innervation of taste buds in the canine larynx as revealed by immunohistochemistry for the various neurochemical markers. *Tissue and Cell*, 29: 339-346.
- Åsén, H. (2010). *Allergenet Can f 5 i hundurin*. Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för kliniska vetenskaper/Veterinärprogrammet (Examensarbete 2010:68)